

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Histología



TESIS DOCTORAL

**Histobiología de la grasa parda. Acción de la hidrocortisona
sobre el tejido adiposo pardo. Efectos cualitativos y
cuantitativos**

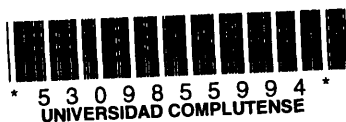
MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Julia Buján Varela

Madrid, 2015

María Julia Buján Varela

TP
1981
122



X - 53 - 070402 - 0

HISTOBIOLOGIA DE LA GRASA PARDA. ACCION DE LA HIDROCORTISONA
SOBRE EL TEJIDO ADIPOSO PARDO. EFECTOS CUALITATIVOS
Y CUANTITATIVOS

Departamento de Histología
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid
1981



BIBLIOTECA

© María Julia Buján Varela
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1981
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-13968-1981

Autor: MARIA JULIA BUJAN VARELA

**Titulo: HISTOBIOLOGIA DE LA GRASA PARDA. ACCION DE LA
HIDROCORTISONA SOBRE EL TEJIDO ADIPOSEO PARDO.
EFECTOS CUALITATIVOS Y CUANTITATIVOS.**

Director: Prof. Dr. D. LUIS ZAMORANO SANABRA

**DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID 1.980**

Volumen I

D. LUIS ZAMORANO SANABRA, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA
DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE - MADRID.

C E R T I F I C A: Que la Tesis titulada "HISTO-
BIOLOGIA DE LA GRASA PARDA. ACCION DE LA HIDRO-
CORTISONA SOBRE EL TEJIDO ADIPOSEO PARDO. EFECTOS
CUALITATIVOS Y CUANTITATIVOS", realizada por D^a.M^a.
Julia Bujan Varela, de la que soy Director, -
reune todas las condiciones necesarias para que
su autor, pueda optar al título de Doctor en -
Medicina y Cirugía, por la Universidad Compluten-
se.

Y para que conste, expido el presente, en
Madrid, a siete de Julio de mil novecientos -
ochenta.

Luis Zamorano Sanabra

DEDICATORIA

A MI ESPOSO

A MIS PADRES Y HERMANOS

R E S U M E N

El objetivo de este trabajo, ha sido realizar una puesta al día de la Histobiología de la grasa parda, así como la valoración de la acción de la Hidrocortisona sobre ella,

Los parámetros elegidos han sido: CUANTITATIVOS (peso corporal, peso del órgano interescapular, diámetro de los adipocitos y número de gotas/adipocito) y CUALITATIVOS (estructura, ultraestructura, histoquímica enzimática y no enzimática).

Primeramente, realizamos un muestreo según las tablas de números aleatorios, estableciendo dos poblaciones: Control, que no recibía tratamiento alguno, e inyectada, con Hidrocortisona a dosis de 5 mg/Kg peso del 5º al 21 día de vida postnatal. Estudiamos en primer lugar, el peso corporal y el peso del órgano interescapular con valoración estadística, para establecer si existen o no diferencias significativas, mediante tests uni y bivariantes, observando que para dichos parámetros no existen diferencias significativas entre ambas poblaciones comparadas; y por otro lado existe una fuerte correlación entre ambos parámetros dentro de cada una de las poblaciones. En segundo lugar, realizamos tests de comprobación similares a los anteriores, para las dos variables aleatorias diámetro de los adipocitos y nº de gotas/adipocitos, resultando que la hidrocortisona no tiene efecto significativo sobre el diámetro de los adipocitos, pero si actúa sobre el nº de gotas, causando una disminución de este número dentro del adipocito al aumentar el volumen de dichas gotas.

La microscopía de luz nos confirmó la diferencia en cuanto al nº y tamaño de las gotas lipídicas, así como un aumento de mastocitos con degranulación patente en la población inyectada respecto a la control. A nivel ultraestructural, hemos resaltaado las características más importantes del tejido adiposo pardo, haciendo incapié en las diferencias anteriores, observando un aumento de la coalescencia de las gotas lipídicas y la degranulación mastocitaria llamándonos la atención la desaparición de glucógeno y la presencia de células de tipo mesenquimatoso de marcado carácter macrofágico que contrasta fuertemente con la población control.

En cuanto a los patrones enzimáticos de diferentes vías metabólicas, hallamos incrementados los enzimas comprometidos en el aprovechamiento de la glucosa como es la G6PDH, que junto a la disminución de la actividad NADH citoplásmica y de los depósitos de glucógeno y aumento de volumen de las gotas lipídicas, -

nos indican que la acción de la hidrocortisona sobre la grasa parda es fundamentalmente lipogénica.

A nivel mitocondrial hay una depresión enzimática general (SDH, MDH, Citocromo, NADH) expresión del bajo aprovechamiento energético para la producción de calor (que es la función más específica de TAP).

La vía lipolítica (lipasa tisular y Esterasas) está ligeramente aumentada, indicando la movilización de los ácidos grasos liberados fuera del adipocito para su posterior aprovechamiento por otros tejidos.

Por último, aunque no con resultados definitivos, confirmamos que el enzima Lipoproteinlipasa, encargado de facilitar la captación de ácidos grasos al adipocito, se halla aumentado, hecho que concuerda con la degranulación mastocitaria - observada.

De todo lo anterior se deduce que la hidrocortisona a la dosis empleada por nosotros, aumenta fundamentalmente la lipogénesis del TAP, incrementando los depósitos de TG, con pérdida del aprovechamiento "in situ". Dado que esta última - función más específica del TAP (que lo diferencia del TAB), podemos afirmar que bajo la acción de la hidrocortisona el adipocito pardo vira su biología de producción calorífica, para pasar a funcionar de forma similar al adipocito blanco, es decir como depósito y regulador energético a través del almacenamiento y liberación de ácidos grasos.

I

INDICE

<u>VOLUMEN I</u>	Pag.
AGRADECIMIENTOS	II
CONCEPTO HISTORICO Y ACTUAL	1
INTRODUCCION	77
MATERIAL Y METODOS	91
RESULTADOS:	
ESTRUCTURALES Y ULTRAESTRUCTURALES	109
HISTOQUIMICOS	116
ESTADISTICOS	133
COMENTARIOS	197
CONCLUSIONES	234
BIBLIOGRAFIA	240
<u>VOLUMEN II</u>	<u>LAMINAS</u>
ICONOGRAFIA	I - LXXV

A G R A D E C I M I E N T O S

III

Dado el gran desarrollo científico y la especialización técnica en los momentos actuales, el planteamiento de un trabajo de investigación abarca en general numerosas facetas que no es posible reunir en un solo Departamento de Investigación, siendo preciso recurrir a los lugares idóneos que nos permiten el estudio que pretendemos realizar. Por ello, a lo largo de la elaboración de esta tesis doctoral ha sido preciso recurrir a otros Departamentos que desinteresadamente se han ofrecido, no solo con sus medios técnicos sino con su aportación humana, queriendo por tanto agradecer la colaboración de todas aquellas personas que han contribuido a confeccionar este trabajo.

Profesor ZAMORANO SANABRA, director del Departamento de Histología y de esta tesis, el cual ha guiado mis pasos por el conocimiento Biológico e Histológico desde mis comienzos hasta la actualidad.

De siempre, él se ha sentido interesado por el tema del tejido adiposo pardo, inculcando en mí esta afición, eligiéndolo desde el primer momento objetivo de mi tesis y ahora tesis doctoral, orientándome paso a paso con absoluta dedicación y entrega.

De forma tan especial, que no puede reflejarse en estas líneas, quiero expresar mi gratitud a la Dr.^a SIMON HUARTE, no solo por su dedicación y entrega en este trabajo, sino también por su contribución a mi formación científica y humana, que día a día me ofrece en el laboratorio que con ella comparto.

Al Profesor J. MERCHAN CIFUENTES, Dr.^a A. IBÁÑEZ y Dr. OYA que con gran entusiasmo han dirigido la parte electromicrográfica e interpretativa.

A todos mis compañeros de este Departamento de los que constantemente he solicitado apoyo, brindándome siempre cordial y desinteresadamente y en especial a D. Joaquín RODRIGUEZ, que tanto en la dotación de material, como con su ayuda personal, ha contribuido.

Al Profesor TAMARIT TORRES, director del departamento de Fisiolo-

IV

gia General que siempre ha mostrado un gran interés personal por el tema, así como a sus colaboradores, en especial a D. ANTONIO GONZALEZ, que ha sido parte fundamental en el diseño y elaboración estadística de este trabajo y al Dr. MARTINEZ CONDE, que desinteresada y cordialmente ha colaborado en la parte bioquímica y puesta a punto de la Lipoprotein-lipasa.

Quiero manifestar asimismo mi más profundo respeto y cariño al Prof. JEAN VAGUE, director de la Clínica Endocrinológica del Hospital Universitario La Timone de Marsella, el cual me enseñó los secretos del tejido adiposo en su parte clínica y adipocimétrica, poniendome asimismo en contacto con el Prof. Agregado de Anatomía Patológica de dicha facultad, Dr. A. CHAMLIAM, que me inició en la disciplina Histoquímica, haciendome participe de sus conocimientos.

También quiero manifestar mi gratitud a D. Miguel MARIN DIAZA RAQUE por su contribución desinteresada en la parte más laboriosa de este trabajo, así como a D^a Encarnación RODRIGUEZ, por la preparación y obtención de muestras electromicroscópicas.

A D^a A. PEREZ VENT, D^a M.-S. CAMPOS y D^a M. C. GALLEGO, por su ayuda en la transcripción de este trabajo.

A CASADO y QUINOFER del grupo central de fotografía del Hospital Clínico por su colaboración iconográfica.

Por último, al Dr. GARCIA-PUENTE, colaborador en la confección de estos ejemplares.

CONCEPTO ACTUAL
DEL
TEJIDO ADIPOSO PARDO

A pesar de haber pasado más de trescientos años desde su primera descripción, la grasa parda sigue siendo tan desconocida y desgraciada- - mente tan ignorada, sobre todo dentro del campo científico médico que podemos definirla de entrada como: "El órgano más desconocido y misterio- - so de nuestro organismo".

Si bien algunos de sus aspectos morfológicos y sobre todo funcio- - nales están siendo esclarecidos, todavía son tantas las lagunas, tantas - las ideas e hipótesis que nos bullen en la cabeza mientras vamos compren- diéndola, que pensamos que en esta tesis nos quedaremos muy cortos con - nuestras aportaciones, pero que ya habremos conseguido un primer objetivo - si logramos interesarnos e interesar en su problemática a la ciencia médica.

De nuestra revisión bibliográfica hemos podido deducir que - todavía desconocemos muchos aspectos del comportamiento biológico del teji- do adiposo pardo, así siguiendo el orden expuesto posteriormente en el capí

pulo siguiente, nos encontramos con los siguientes puntos conflictivos:

- 1º.- Aún no podemos afirmar taxativamente la procedencia embiológi- -
ca del tejido adiposo pardo, ni las relaciones embriológicas con
el tejido blanco o la capacidad de diferenciación e involución
de una a otra variedad adiposa. Por otro lado, ideas de antiguo
consolidadas como la incapacidad mitótica del tejido graso adul-
to, nuevamente está replantándose lo que nos hace considerar -
bajo otro enfoque los caminos de crecimiento y regeneración del
órgano graso.
- 2º.- Aunque parece bien definido que el mecanismo de producción caló-
rica de la grasa parda, (rasgo que la aleja morfológicamente y fun-
cionalmente de la grasa blanca y la da autonomía), es precisamente
un desacoplamiento entre respiración y fosforilización oxidativa,
todavía se desconocen los mecanismos íntimos de tal desacoplamien-
to y sus últimos responsables.
- 3º.- Por el momento parece menos conflictiva quizás por ser menos es-
tudiada la vía de aprovechamiento energético para su transfor-
mación en calor. Todo sugiere que este aprovechamiento y conver-
sión en calor se realiza a tres niveles fundamentales: Mitocon-
drial, Citoplásmico y en membrana plasmática, siendo el calor -
resultante la suma del obtenido en estos tres niveles.
- 4º.- Pero vuelven a plantearse problemas respecto a los mecanismos de
control en el funcionamiento del tejido pardo. La mayor parte de
las investigaciones se han centrado siempre en el papel que de-
sempeñan la Norepinefrina (NE), bien directamente, bien vía ner-
viosa a través de su rica inervación, pero el papel que otras -
hormonas juegan, no ha sido aclarado suficientemente, encontrán-
donos con toda una gran gama de intentos variados en la literatu-

ra. Y así, mientras acciones hormonales como las de la insulina están bastante estudiadas, otras como las de los glucocorticoides presentan todavía muchas lagunas y sobre todo, gran parte de los datos bibliográficos son contradictorios o paradójicos.

Por esta razón nosotros nos hemos centrado en este tema, intentando valorar la acción concreta de la Hidrocortisona en Grasa Parda aquellas dosis que hemos considerado que puedan aclarar las contradicciones y datos paradójicos, actuales, centrándonos además en ratas de edad postnatal (de 1 a 21 días) pensando en la aplicación que pueda tener el presente trabajo en clínica humana, es decir en pediatría, toda vez que solo en edades infantiles está presente este órgano en la especie humana.

Pero dado que el tejido adiposo pardo en primer lugar no — suele ser ni objeto de interés, ni bien conocido, en la rama médica; y sobre todo porque su problemática supera con mucho los planteamientos de nuestra tesis, nos ha parecido oportuno comentar un poco ampliamente en el capítulo de concepto, una revisión histórica de este tejido — aún a costa de alargar esta parte y de salirnos de nuestro tema estricto, hecho que, por otro lado, nos va a permitir centrarlo idóneamente.

Así pues comenzaremos por preguntarnos: ¿Que es la Grasa Parda?,
¿Cual es el conocimiento que de ella tenemos?,

A lo largo de la Historia, el tejido adiposo pardo se le han
ido asignando numerosos papeles. En el año 1.949, Rasmussen y Johansson,
reconocieron cuatro momentos estelares con respecto a la interpretación
del tejido.

1º.- 1.870 - 1.817, el tejido adiposo pardo es considerado como —
parte del timo.

2º.- 1.817 - 1.863, el tejido adiposo pardo se interpreta como una
glándula endocrina, y por algunos autores como un órgano acti
vo en la formación de la sangre.

3ª.- 1.863 - 1.902, la grasa parda es considerada como una forma modificada de grasa blanca, sirviendo de almacén de sustancias alimenticias.

4ª.- 1.902 - 1.961, en que el tejido pardo es considerado de nuevo como un órgano endocrino.

Actualmente es posible añadir un quinto periodo:

5ª.- 1.961, hasta nuestros días, en el que el tejido adiposo pardo es interpretado como un agente termogénico, esto es, un tejido con la función de calentar la sangre cuando pasa a su través y con ello contribuir al mantenimiento de la temperatura corporal.

Smith (3), Ball y Jungas (4), fueron los primeros en demostrar claramente el tejido adiposo pardo es el lugar de termogénesis; pusieron de manifiesto la diferencia fundamental entre las propiedades aislantes de calor y almacenadoras de grasa del tejido adiposo blanco, y la capacidad productora de calor del tejido adiposo pardo.

Su descubrimiento ha estimulado la investigación hacia la Bioquímica y Fisiología del tejido adiposo pardo. Esto se refleja en el gran número de trabajos sobre varios aspectos de este tejido.

Terminología: El término tejido adiposo pardo, es el más comúnmente usado, pero desde 1.920, se han venido utilizando diversos nombres, como: Glándula de hibernación; grasa parda; tejido adiposo multilocular; tejido adiposo glandular; glándula lipídica; glándula colesterínica; glándula embrionaria; tejido adiposo en formación; grasa primitiva y glándula interescapular.

Esta profusión de términos y el hecho de que la mayoría de ellos sean descriptivos y morfológicos no deja de indicarnos un mal conocimiento de esta estructura y sobre todo incertidumbre en la evolución del tejido.

Nosotros lo designaremos con las siglas TAP de tejido adiposo - pardo, y con los de TAB nos referimos al tejido adiposo blanco, equivalentes en inglés BAT y WAT respectivamente.

El problema de su origen embriológico y ontológico

Desde el punto de vista embriológico parece totalmente preestablecido que el tejido adiposo, en sus variantes blanca y parda, procede de la hoja embrionaria mesodérmica a través del mesénquima con diferenciación subsiguiente de este, si bien no existe ningún trabajo embriológico en edades tempranas que justifique plenamente este hecho.

Por otro lado, no existe acuerdo entre los diferentes autores respecto a si el tejido blanco y pardo, tienen una misma procedencia del mesénquima con vías lipogénéticas independientes, o si el tejido adiposo pardo, viene a suponer el estudio embrionario o inmaduro de tejido adiposo blanco.

Dado, por tanto, que no podemos en principio separarlos, empezaremos por abordar conjuntamente el desarrollo de ambos para después mostrar las aportaciones que la literatura nos lega de la lipogénesis del tejido adiposo pardo concreta y exclusivamente,

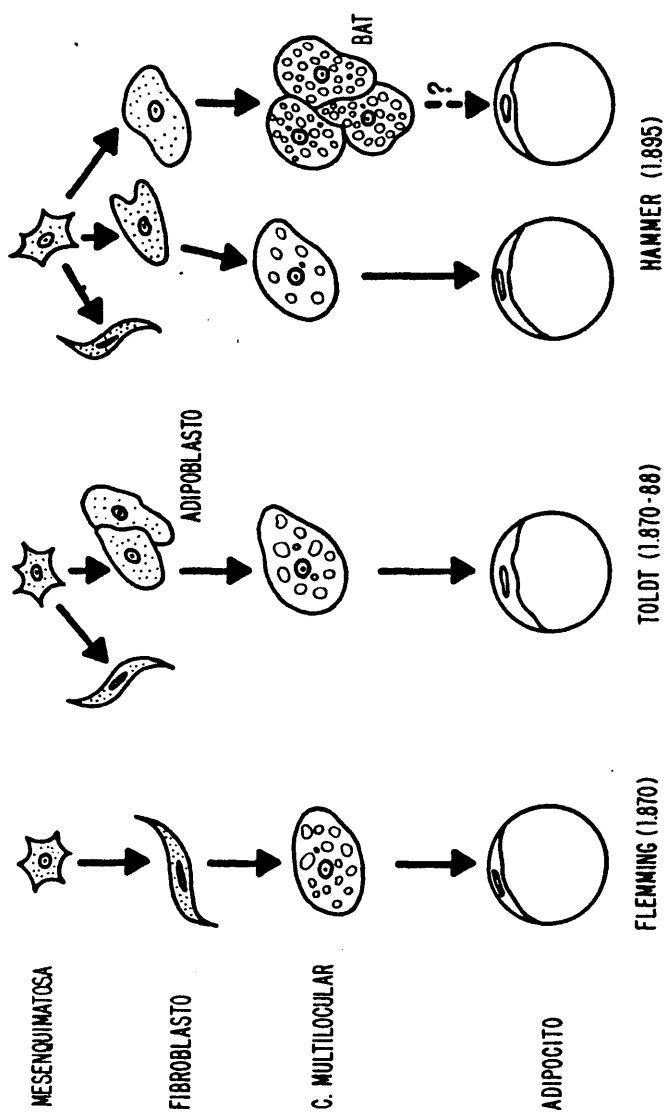
Se viene admitiendo que tejido adiposo blanco y tejido adiposo pardo derivan del mesodermo a través del mesénquima embrionario. El primero en plantearse el problema de su origen fué Flemming en el año 1.870, y

desde entonces hasta la actualidad podemos decir que se han establecido tres hipótesis lipogénéticas, encabezadas respectivamente por Flemming - (5,6,7), Toldt (8) y Hammer (9), y los estudios de los demás autores, a a un los más recientes, no han venido más que a corroborar una de esas tres hipótesis, sin llegarse todavía a una postura clara y taxativa.

Flemming (1.870 - 1.879), sugirió que el tejido graso deriva directamente del tejido conjuntivo a través de fibroblastos alargados, - que progresivamente irían cambiándose de gotas lipídicas. Apoyan esta pos tura autores como Ball (10), Foot (11), Kölliker (12) o como Robin L.R. Van y cols. (13), que en 1.878 realizaron cultivos de fibrocitos humanos y de rata, observando que los fibrocitos cultivados procedentes del estro ma del órgano graso se transforman en adipocitos, mientras que los proce dentes del tejido conjuntivo dérmico no acumulaban nunca grasa ni se dife renciaban. Clark (14), demostró que en el desarrollo del tejido graso, - las células germinales o adipoblastos se encuentran tanto en las proximi dades de las yemas capilares como alejados de éstas, suponiendo, por tan to, que las células madres no serían procedentes de los vasos, sino que estarían ya presentes en el esbozo orgánico previamente a su vasculariza ción; pensó que muy bien podrían ser fibroblastos como había sugerido - Flemming.

Toldt (1.870 - 1.888), casi simultáneamente a Flemming, demostró la presencia de "células mesenquimatosas específicas" en algunas áreas de tejido mesenquimal, suponiendo que serían las precursoras del órgano gra so a través de un estadio intermedio que definió como "Adipoblasto": Cé lula estrellada, con acúmulos lipídicos distribuidos en pequeñas gotas. En ningún caso vió, ni admitió, una transición directa del fibrocito al adipoblasto, sino que, por el contrario, opinó que los fibrocitos serían diferenciaciones distintas de la célula mesenquimal que jamás acumularían lípidos y que solamente acompañarían estructuralmente a la grasa.

ESQUEMA I



(Tomado de BLOOM -, FAUCETT ; 1.973.)

Hammer (1.895) emitió una tercera hipótesis y además le cabe el mérito a este autor de distinguir, por vez primera, dos caminos lipogénicos independientes para el tejido adiposo blanco y el tejido adiposo pardo y establecer sus relaciones embriológicas.

Para Hammer primero sucedería la formación de los llamados "órganos grasos primitivos". Estos son formaciones reticulares, más o menos densas, constituidas por células mesenquimatosas que van siendo invadidas por yemas vasculares, que gradualmente irían ramificándose y capilarizándose. Dichos centros pueden ser de dos tipos. Unos altamente organizados y lobulados que podemos considerarlos como los precursores del tejido adiposo pardo, y otros con un nivel de organización menor, precursores o esbozos del tejido adiposo blanco.

Aunque los mecanismos lipogenéticos son similares en ambos centros, estos difieren en su organización, caminos inductores de diferenciación, velocidad de crecimiento y maduración, y al final tanto la estructura como el sentido funcional serán también diferentes.

En ambos centros el responsable de la diferenciación, para Hammer, es la vascularización. Acompañando a las yemas vasculares irían células madres grasas que se liberarían en el primitivo centro adiposo. - Estas células para Hammer serían elementos endoteliales, y para otros - autores pericitos o células reticulares emigradas, en suma elementos del llamado "Sistema retículo endotelial", mientras que las células mesenquimales sólo serían soporte y evolucionarían al tejido conjuntivo circundante de la grasa. Los elementos precursores de la grasa o adipoblastos tienen un aspecto alargado o con groseras y cortas prolongaciones y tienen como signo distintivo el ser vacuoladas, con escasas vesículas de contenido graso. Cuando estos elementos asientan en un órgano primitivo graso reticulado originarían células multivacuoladas del tipo pardo, si, por el contrario, asientan en un órgano poco reticulado darán adipocitos blancos.

(ver esquema I)

Esta teoría de Hamner ha sido apoyada múltiples veces en la literatura: Levi (15), Wasserman (16), Hull (17), Hull y Segall (18) Aherne y cols. (19), Bernard (20), así como Kolliker (12) que contrariamente a Clark (14), observó la aparición de las células madres a lo largo de los vasos sanguíneos y sus ramas.

Es evidente que, aunque las diferentes experiencias vengan a - confirmar una u otra postura, el problema de si la célula madre adipogénica es el fibrocito, la célula mesenquimal, o células del S.R.E., todavía hoy sigue vigente.

No obstante, si algo ha quedado suficientemente claro en la literatura son los cambios morfológicos que sufre esa hipotética célula — primitiva hasta su maduración a célula adiposa. Así lo demuestran comunicaciones como las de Sidman (21), Simon (22), Bernard y cols. (23,24,25), Skála y cols. (26,27), Flawark y cols (28) y Dyer (29). Quizá el trabajo más detallado y que cubre un mayor tiempo de desarrollo sea el de Bernard y cols (30), que estudian el desarrollo del tejido adiposo blanco, desde el 15 día de la gestación (6ª prenatal) hasta el 30 después del nacimiento, haciendo una detenida descripción de los días previos al nacimiento 6ª, 3ª y 1ª, en el día del nacimiento y días siguientes a este: 5ª, 15 - y 30. Descripción que a nosotros nos interesa no sólo desde el punto de vista embriológico y madurativo, sino también, como punto de referencia comparativo de nuestro material, que corresponde a los tiempos del 5º al 21 días posnatales, aunque nuestra atención se centre en el tejido adiposo pardo.

En el día 6 previo al nacimiento se observa una estructura reticulada, incipientemente vascularizada y cuyas células son todavía inmaduras. Estas, gradualmente van aumentando de tamaño y adquiriendo forma poligonal; el núcleo de ser hiper cromático va evidenciando uno o dos nucleolos, expresión de una mayor actividad; los abundantes ribosomas y

polirribosomas libres van haciéndose cada vez menos numerosos y ordenándose en la periferia de las gotas lipídicas; el retículo endoplásmico pasa de ser escaso y de variedad rugosa a ser más abundante y liso, siendo — también numeroso y llamativo su componente vesicular; las mitocondrias — al principio relativamente escasas y alargadas van haciéndose cada vez — más abundantes, para alcanzar su máximo desarrollo es, los días 15 y 30 posnatales en que llegan a ocupar una parte importante del citoplasma, — el desarrollo de sus crestas es igualmente progresivo y también va aumen— tando la electrodensidad de la matriz, datos en suma indicativos de una gran actividad mitocondrial, además, es de señalar que a partir del ter— cer día antes del nacimiento empiezan a aparecer en su matriz gránulos — densos redondeados de 300 Å de diámetro interpretados por algunos autores (26,30) como productos de degeneración de las membranas mitocondriales, y por otros autores como de significación desconocida pero siempre presen— tes sólo en edades juveniles. Finalmente, de forma más eventual, pueden encontrarse cuerpos mayores de disposición lamelar, sujetas también a con— troversias en su interpretación. En el citoplasma y de forma precoz, pue— den encontrarse depósitos de glucógeno que irán progresivamente aumentan— do; y por último, el dato morfológico más distintivo de la diferenciación es la presencia de triglicéridos depositados en forma de gotas o inclusio— nes citoplásmicas, al principio de pequeño diámetro, aumentarán en número y tamaño hasta llegar al nacimiento, momento en el cual se observa una de— pleción brusca coincidiendo con la presencia de vacuolas autofágicas, que irán desapareciendo del día 1º al 30 del desarrollo posnatal, mientras — que el componente lípido vuelve a incrementarse numéricamente para final— mente ir coalesciendo las vesículas lipídicas y pasar al estadio unilocu— lar.

De todo ello podemos concluir que la célula grasa en su diferen— ciación adquiere capacidad de reserva energética, lipídica y glucogénica, y que los datos morfológicos expresivos de tal diferenciación son:

- Presencia de gotas lipídicas (triglicéridos) en principio poco numerosas y pequeñas que paulatinamente irán haciéndose más numerosas y luego, tras coalescer, mayores, hecho que únicamente se verá interrumpido en el momento del nacimiento indicando una destrucción lipolítica, posiblemente para regular la temperatura basal - bruscamente afectada en el paso temperatura intraútero/temperatura ambiente.
- Mitochondrias cada vez más abundantes y activas, indicando que están implicadas en los procesos lipogénéticos y lipolíticos. Y junto a ellas un desarrollo de R.E. Liso también comprometido en la lipólisis por su secreción de Lipasas.
- Por último, abundantes depósitos de glucógeno.

Es para nosotros, en esta tesis, más importante dilucidar las posibles relaciones ontogénicas de los dos órganos grasos: pardo y blanco y aunque Hamner desde 1.895 nos ha dejado planteado un mecanismo independiente de diferenciación en ambos, han sido muchos los autores que, apoyados en datos experimentales han etiquetado al tejido adiposo pardo como el estadio embrionario de tejido adiposo blanco.

Hechos como: La aparición de células uniloculares en áreas del tejido adiposo pardo y presencia, incluso de células con imagen transicional; evolución de células multiloculadas a uniloculadas en experiencias de denervación o viceversa, de uniloculadas a multiloculadas en condiciones de ayuno, o en adipocitos blancos de bajo contenido graso; y como no, el apoyo de datos embriológicos que demuestran que para la formación del tejido blanco obligatoriamente ha de pasarse por la forma multilocular o morular. Todos estos datos han sido reiteradamente señalados en la literatura por: Aherne y Hull (19), Hull (17), Napolitano (31)(32), Rasmussen (1), Smalley (33), Clark (14) y Vogue (comunicación personal), y nos llevan indefectiblemente a la idea de que el tejido adiposo pardo, no sería más que una forma inmadura de tejido adiposo blanco, aunque tenga funciones propias.

Sugieren también estas observaciones que el tejido adiposo pardo sería la forma involutiva y degenerativa del tejido adiposo blanco.

No obstante, esta idea no es universalmente aceptada, más aún parece que actualmente se tiende a la idea contraria; el mismo Rasmussen no consiguió en sus experiencias encontrar la transición morfológica entre los dos tipos de grasa. Realizó trasplantes de grasa parda - al órgano adiposo blanco, y aunque hubo transformación, no se pudo dilucidar, si esta se debe a un condicionamiento diferencial local o a la simple denervación consiguiente a la extirpación; Smalley (33), en sus estudios del tejido adiposo pardo de hamster, encontró que en zonas habitualmente ocupadas por grasa parda en el individuo adulto, podía haber células uniloculares en estadios de recién nacido y estas no procedían de células multiloculares reconocibles, sino que derivan directamente del mesénquima, este hallazgo es sólo aparentemente contradictorio con los descritos en el desarrollo de la grasa blanca, y más bien nos viene a confirmar que ambas tienen un origen común y que pueden, - coexistir en determinados momentos pero sin que, por ello, pueda presumirse la transición de una a otra. Así, nunca podríamos considerar al tejido adiposo pardo como la forma embrionaria del órgano blanco.

Napolitano (31), en su estudio ultraestructural del tejido adiposo pardo de rata en desarrollo en el año 1.966, confirma esta idea, - al encontrar diferente estructura mitocondrial en los dos tipos de grasa. Las mitocondrias de las células grasa blancas tienen crestas menos numerosas, no orientadas respecto al eje y que no ocupan toda la matriz a diferencia con las mitocondrias de células pardas. Igualmente las células uniloculares encontradas en la región de la grasa parda exhiben diferente morfología que las del órgano blanco y por último una reflexión sobre la función altamente específica que tiene el tejido adiposo pardo, nos impone la idea de que, desde luego, son órganos diferentes y entre los que resulta difícil admitir un intercambio.

Regeneración y Crecimiento

Fué Simón (1.966) (22), el primero en observar, que en el momento en que aparecían los primeros depósitos grasos en los adipoblastos, estos perdían su capacidad mitótica. Apoyándose en esta observación, y otras subsiguientes, se ha venido admitiendo que el tejido adiposo adulto no tiene capacidad de división celular y que su crecimiento se realizaría exclusivamente por hipertrofia de un determinado número de adipocitos ya existentes.

Posteriormente publicaciones demostraron que hasta el primer año - de la vida puede seguir la diferenciación a partir de adipoblastos y en - segundo lugar que durante este tiempo conservan capacidad mitótica, mientras que a partir del primer año únicamente pueden acontecer mecanismos de hipertrofia. Basándose en esta idea, incluso la patología médica contempla dos tipos diferentes de obesidad (Farreras) (34):

- Obesidad hiperplásica, o infantil, o difícilmente recuperable.
- Obesidad hipertrófica, o adulta o recuperable.

Recientemente vienen apareciendo publicaciones, fundamentalmente de naturaleza autorradiográfica, bioquímica y funcional, a través de - reguladores e inhibidores, que nos dan una nueva y radicalmente diferente idea del crecimiento y regeneración grasa.

Lewis y Hayer (1.974), mediante la utilización de timidina tritiada en el tejido adiposo pardo de ratas, han venido a demostrar, que las mitosis en los adipocitos pueden observarse hasta en edades adultas. En su estudio, realizado en ratas de 6 a 22 semanas, hacen mediciones con isótopos radiactivos del índice mitótico, tanto en las células del estroma (posible asiento de lipoblastos) como en las células parenquimatosas, observando que en edades todavía infantiles, el marcaje de las células -

del estroma es muy alto y medio el de los adipocitos, con el tiempo va disminuyendo en ambos, pero este descenso es aún más llamativo en las células del estroma que en los adipocitos y además en estos persiste el marcaje, (aunque sea bajo) incluso en edades adultas.

Frutos paralelos tiene otros trabajos con isótopos radiactivos, en los que tras una única inyección de timidina tritiada se va midiendo la disminución de concentración de los granos de marcaje por células en tiempos sucesivos, hecho totalmente sugestivo de una actividad mitótica capaz de diluir, por reparto, el marcaje.

Es de antiguo conocido, que la síntesis de DNA del tejido adiposo blanco se ve incrementada por la insulina, corticoides, suero humano, hormonas placentarias de tipo lactógeno; mientras que disminuye en condiciones de ayuno y tras la inyección de diabéticos como, el Aloxián, restituyéndose en estos casos con la inyección de insulina. Últimamente Hayes, ha demostrado la disminución en la incorporación de timidina y por lo tanto de la síntesis de DNA al administrar Fenfloridina. Finalmente, otros factores, como la Triiodotironina, la Melanotonina epifisaria (36) hormonas sexuales y esteroideas, pueden producir un crecimiento graso por hipertrófia.

A la vista de todas estas aportaciones, aunque autores como — Afzelius (37), no admiten la idea y sugieren incluso fallos técnicos, parece obvio considerar que el crecimiento y regeneración del tejido adiposo se hace por mecanismos de hiperplasia a los que se pueden sumar otros de hipertrofia, y dentro de la hiperplasia pueden participar en primer término los lipoblastos persistentes en el estroma y (aunque en menor proporción), los mismos adipocitos diferenciados y adultos. Siendo este mecanismo de hiperplasia más acentuado en edades juveniles pero también realizado en la edad adulta.

Evolución filogenética y su significado

Aunque no hay indicios de una termogénesis /hibernante real más que en los mamíferos e incluso no se ha demostrado la existencia de grasa parda más que en estos animales, se viene considerando que este órgano, tiene su asiento entre los homeotermos (aves y mamíferos) y que es posible que sus predecesores más remotos sean los reptiles pérmicos y algunos peces primitivos como los seláceos. Incluso se ha tratado de buscar órganos y tejidos con similitudes morfológicas y/o funcionales en seres inferiores en la escala filogenética, como en los mismos insectos.

El primer esbozo comparable funcionalmente con el tejido adiposo pardo, dentro de la escala filogenética, ha sido descrito por Taranov y Hess, en las ABEJAS, en el capítulo relativo a aspectos filogenéticos del tejido adiposo pardo del texto de O.Lindberg (38), [texto del cual hemos tomado gran parte de los datos histológicos del tejido adiposo pardo, reflejados en nuestra revisión,] que siendo animales poiquilotermos son capaces de aumentar sus procesos metabólicos para llegar a su temperatura óptima (20 a 24°C), pero no es conocido el metabolismo íntimo de este proceso, pudiendo deberse a una producción de energía muscular o a un proceso de termogénesis no hibernante. De todas formas, entre los INVERTEBRADOS, solamente se han descrito adipocitos en la sanguijuela (Bradbury, 1.958) (38) y en algunos insectos. Estos adipocitos tienen pocas o moderadas mitocondrias y nunca son del mismo tipo que los del tejido adiposo pardo.

La existencia de sangre caliente en peces, ha sido descrita - en 1.966 y 1.969, por Carey. Los atunes y dos especies de tiburones pueden aumentar 10°C su temperatura sobre la del agua, sin embargo esto se viene explicando por un mecanismo circulatorio, en el cual la especial disposición del sistema vascular y su circulación protege y defiende el medio interno animal del descenso de la temperatura. Desde el punto de vista morfológico, el tejido adiposo de los peces, no se ha examinado al microscopio

electrónico y una de las pocas aportaciones que nos ofrece la literatura es que los adipocitos de la zona perimeníngea de la lamprea, muestran es tructura con algunas, pocas, gotas lipídicas y mitocondrias delgadas con crestas altamente empaquetadas (Möller (38)) que difieren tanto del tejido blanco como del pardo.

En los ANFIBIOS, los lóbulos grasos perigonadales estudiados - por Barkow en 1.846 (38), recuerdan al tejido adiposo pardo más que al - blanco a microscopía óptica y anatómicamente, pero la microscopía electró nica demuestra que ni se parece al blanco ni al tejido adiposo pardo, y - que además sus mitocondrias son poco típicas (Bergman (38)).

Los HOMEOTERMOS (Aves y mamíferos) son capaces de cambiar su - temperatura corporal en condiciones desfavorables centrandose en hibernación y al despertar de esta, mostrar un marcado aumento de la actividad metabó lica (Koskimies 1.948 y 1.950. Marshall 1.955 y otros). Pero dentro de - las AVES, solo se conoce el caso del "vencejo", que puede aumentar en más de 10°C su temperatura corporal durante solo 20 minutos, con un peso cor poral de 48 grs. y sólo 7 grs. de tejido graso. El vencejo tiembla vigoro samente al despertar regulando el cambio de temperatura por caminos termo genéticos y durante el proceso, pierde sus 7 grs. de grasa. Morfológicamen te el tejido adiposo de las aves ha sido estudiado al microscopio óptico en 1.930 por Clara (38) y al electrónico en 1.966 por Luckenbill (38), en él los adipocitos pueden ser uni o multiloculares, pero las mitocondrias son escasas y poco típicas.

Todo ello viene a confirmar lo que al principio decíamos, que - no hay evidencia de tejido adiposo pardo fuera de los mamíferos, ni indi cios de una termogénesis hibernante más que en algunas clases de estos, - aunque es posible que el mismo tipo o muy parecidos fenómenos a los que - ocurren en el tejido adiposo pardo, se den más o menos extensamente en - otros tipos celulares. En este sentido hay que recordar que en la hiber

ción de la ardilla es en las células musculares donde aumentan mitocondrias y crestas.

Dentro de la clase Mammalia se distribuye en siete órdenes: Chiroptera, Insectivora, Rodentia, Lagomorpha, Artiodactyla, Carnivora, y Primates (Remussen) (1).

ANATOMIA

Dentro de los mamíferos, la distribución anatómica, es casi la misma en todos los grupos. La mayor porción de tejido adiposo pardo se encuentra situado entre las escápulas, en forma de una delgada lámina romboidal. Otra porción del mismo se extiende alrededor de los músculos y vasos sanguíneos del cuello y extensiones del mismo, pasando debajo de las clavículas hacia las axilas, recubriendo los grandes vasos del tórax. Igualmente pueden existir pequeñas masas en el mediastino, entre el esófago y la tráquea, alrededor del timo, entorno de ganglios autonómicos, tejido cromafín, y finalmente como una importante localización inguinal.

Dado que nuestro trabajo se efectúa en rata, nos ocuparemos de describirlo más detenidamente en este animal. Su descripción macroscópica completa, fué dada por Hammer (1.895). El cual describe una masa en abdomen entre los riñones, penetrando por el hilio renal, alrededor de la aorta abdominal y a lo largo de los uréteres y región inguinal. En el tórax, la rata, tiene grandes masas de tejido adiposo pardo, sobre todo en la región interescapular el cual va a ser el objeto de nuestro estudio, en este trabajo, y en menor cantidad en la axila y porciones superficiales y profundas a lo largo de los grandes músculos de la zona; - otras veces en la aorta descendente y/o en la cavidad mediastínica. Por último, también se puede encontrar una pequeña representación en la región cervical.

La cantidad de tejido adiposo pardo en la rata es entre 0,75 y 4,35 grs. que, según Hammer (9) es equivalente al 0,60 - 1,65 % del peso corporal. Siendo la variación entre los diferentes animales más pequeña que para el tejido adiposo blanco.

Cuando las ratas se mantienen entre 0° y 4°C, la cantidad de te
jido adiposo pardo aumenta más que el doble (39, 40, 41 y 42), estiman -
que el aumento de ácidos grasos libres secos, aislados del tejido adiposo
pardo, después de la aclimatación al frío, es del 70 al 80 %. El aumento
en masa mitocondrial es proporcionalmente todavía mayor, según Smith y
cols. (43) o alrededor del 35 % expresado en nitrógeno mitocondrial. En
ratas adaptadas a frío, de 170 gr. de peso, es posible disecar entre 0,9
y 1,2 gr. de tejido adiposo pardo interescapular.

Mayor interés que los cambios por la exposición a frío, tienen
para nosotros, los aumentos y variaciones del tejido adiposo pardo en la
rata recién nacida, en la cual tanto la cantidad de tejido adiposo pardo
como su funcionamiento termogénico, varían de acuerdo con la temperatura
ambiente a que estén mantenidas y la protección materna o privación de la
misma.

Siendo el nacimiento un momento crítico en que el animal tiene
que pasar de la temperatura de neutralidad del recién nacido (37°C), —
primero a temperatura ambiente y, después, en el transcurso de 21 días —
como máximo, a la temperatura de 28°C., o de neutralidad térmica de la -
rata adulta. Los mecanismos termogénicos del tejido adiposo pardo cobran,
por tanto, mucha importancia en este período.

Estos mecanismos cambiarán de acuerdo con la temperatura ambien
te, como ya demostraron R. Portaf y Cols. (1.978), en tres grupos de ratas
mantenidas a: 16, 23 y 28°C., respectivamente, y midiendo en ellas a lo -
largo de 21 días los siguientes parámetros: Peso corporal de la rata, pe
so del tejido adiposo pardo, nivel de lípidos y agua del tejido adiposo
pardo y tasa de norepinefrina.

Si las ratas nacen y se mantienen a 28°C., con protección mater
na, el mecanismo de termogénesis del tejido adiposo pardo será muy reduci

do. Las ratas pierden muy rápidamente las características que tenían al nacer, alcanzando pronto la temperatura de neutralidad adulta. Sus características funcionales son siempre inferiores a las de los otros dos grupos: El peso corporal crece linealmente pero a una velocidad de crecimiento muy inferior a las mantenidas a 16 y 23°C.; el peso del tejido adiposo pardo se mantiene casi constantemente; el nivel de lípidos, aunque aumenta hasta el día 14, es siempre superior al de los otros grupos y la cantidad de agua por el contrario es inferior. Corroboran estos hechos la tasa de norepinefrina, que alcanza los niveles del adulto hacia el día 11.

Cuando las ratas son mantenidas a 23°C., con protección materna, el tejido adiposo pardo, conserva las características funcionales (aumento de masa, bajo nivel de lípidos y alto de agua) hasta el día 11. La masa del tejido adiposo pardo crece linealmente hasta el día 11, para continuar después hasta el 21; la cantidad de lípidos es dos veces menor que en las ratas mantenidas a 28°C., y continúa así hasta el día 14, en que aumenta; la cantidad de agua, superior al primer grupo al principio, después baja. A partir del día 7, hay un incremento notable en las tasas de norepinefrina, que alcanza su acmé llegado el día 11 para ir disminuyendo paulatinamente, indicando el tiempo de mayor actividad termogénica. Este y el resto de parámetros se igualan con las ratas mantenidas a 28°C. a los 21 días.

En las ratas mantenidas a 16°C., el crecimiento ponderal de los animales es lineal y mucho más rápido que a otras temperaturas más altas; igualmente es notable el incremento en el peso de tejido adiposo blanco; su contenido en lípidos es muy bajo hasta el día 11 y siempre inferior, hasta el día 21, a los otros dos grupos; la cantidad de agua, aunque gradualmente irá disminuyendo, superará a la de las ratas mantenidas a más temperatura. Finalmente el contenido en norepinefrina aumenta considerablemente en los primeros 14 días, para igualarse con los otros dos grupos

en el día 21. Todo ello nos indica que el funcionamiento termogénico - del tejido adiposo pardo en las ratas mantenidas a 16°C., permanece has ta los 21 días en que se alcanzará la temperatura de neutralidad adulta.

ESTRUCTURA Y ULTRAESTRUCTURA

Referida ya la distribución anatómica vamos a estudiar el aspecto macroscópico e histológico del tejido adiposo pardo. Al efectuar la disección, de la grasa parda de región interescapular, nos encontramos con un órgano bien delimitado, de aspecto homogéneo al corte, dispuesto de lóbulos a su vez formados por lobulillos, de color pardo oscuro y abundante vascularizado. El estudio histológico demuestra que el órgano se encuentra rodeado por una fina cápsula de carácter conjuntivo, de la cual parten hacia el interior tabiques cada vez más ramificados y finos, que en principio encinturan lóbulos y después lobulillos hasta, por fin, rodear casi individualmente a cada elemento celular; dichos tabiques van perdiendo riqueza en fibras colágenas conforme se adelgazan y aproximan a las células, momento en el cual el principal componente de los septos será la reticulina. Perforando la cápsula y acompañando a los tabiques conjuntivos encontramos gran cantidad de vasos y nervios que también gradualmente irán ramificándose y dando una red fina que terminará en las vecindades celulares; los capilares, siguiendo un patrón endocrino, rodearán a cada célula separándose de ella únicamente por una membrana basal y eventuales fibras de reticulina; las terminaciones nerviosas abordarán con una fina yema terminal, los elementos celulares. Estos últimos son poligonales, multivesiculares y con núcleo centralizado. - (Fig. 1).(Fig. 2).

Empezaremos por describir el tejido conjuntivo, vasos y nervios, para después abordar el aspecto ultraestructural y microscópico del componente celular.

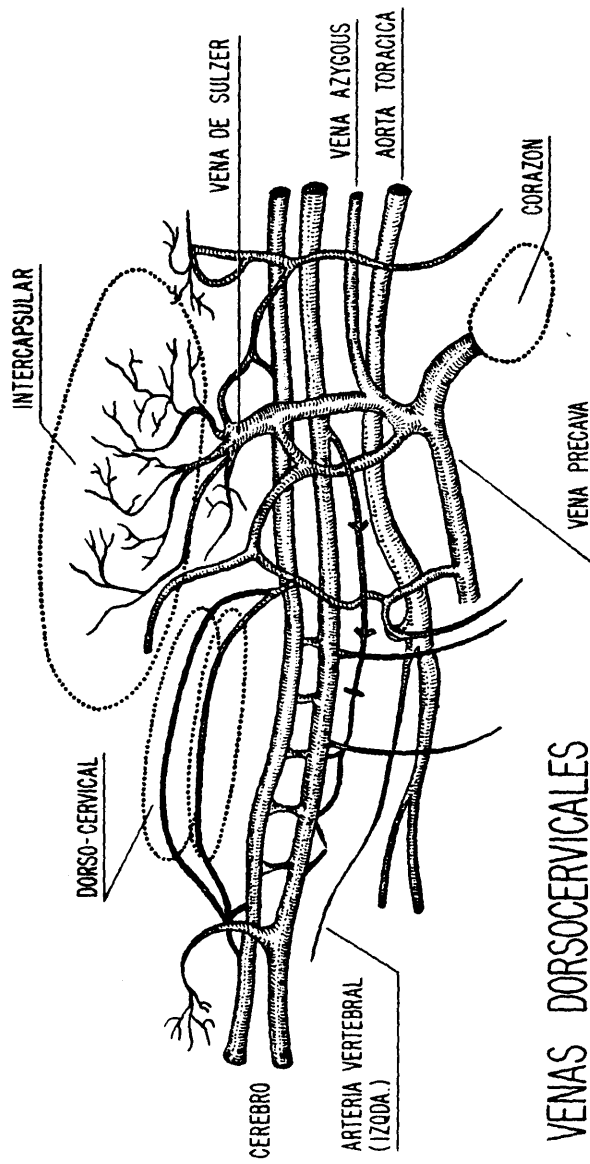
VASCULARIZACION DEL TEJIDO ADIPOSO PARDO

La vascularización de la grasa parda es de 4 a 6 veces superior a la de la grasa blanca, en la rata (Hausberger y cols. 1.963), Smith y Horwitz (43). A nivel del tejido adiposo pardo interescapular esta vascularización procede de ramas del tronco cervical que a través de la arteria toraco dorsal alcanzan el órgano graso. El drenaje venoso es de doble naturaleza: Uno de los caminos supone el retorno anatómico del anterior, es decir, a través de las venas toraco dorsales la sangre retorna a la subclavia y de aquí a la vena cava superior; en otro camino las venas del tejido adiposo pardo, confluyen en una central que desemboca directamente en el plexo vertebral a nivel de T-4, para avocar después, junto con las venas de T-5 y T-6, a través de la vena 4ª torácica (primitivamente denominada de Sulzer's) en la vena ácigos y posteriormente encontrar a la cava superior. Ambos caminos de retorno tienen carácter bilateral. (Esquema II).

La gran vascularización es una de las características del tejido adiposo pardo que además contribuye a su color pardo oscuro, por la presencia de gran cantidad de hematias y hemoglobina, junto con la riqueza en citocromooxidasas mitocondriales (Simon (22)). También a esta profusión de vasos se debe el que se la haya comparado y considerado como una glándula endocrina. La razón de esta riqueza vascular no es otra que facilitar los mecanismos termogénicos del tejido adiposo pardo, ya que al exponer una gran superficie capilar a los adipocitos estos calientan antes y más fácilmente, la sangre.

En los animales hibernantes, en el momento de la hibernación, se sabe que hay un aumento del flujo sanguíneo a través de los capilares del tejido adiposo pardo, cuyos mecanismos de regulación sólo se conocen en parte, pero en el que participa, desde luego una vasoconstricción de

ESQUEMA II



VENAS DORSOCERVICALES

(Tomado de Smith and Harvitz, 1968)

las arteriolas o arterias reguladoras que poseen una gruesa capa de tejido muscular (Boerner-Patzel (38)). El mecanismo sería, por tanto, comparable al que realiza el glomus cutáneo a nivel vascular terminal, principalmente en el pulpejo de los dedos, para regular el riego distal y la temperatura de las zonas acras.

Los capilares, como pone de manifiesto el microscopio electrónico, son de tipo continuo y no difieren de los que de este tipo existen - otras localizaciones. Las células endoteliales descansan sobre una membrana basal continua y en ellas llama la atención la riqueza de vesículas de pinocitosis y la ausencia de fenestraciones, finalmente las células endoteliales vecinas se unen a través de uniones esenciales tipo tight Gap (38). Además de estos rasgos generales de la célula endotelial, a veces han sido descritos otros menos usuales como la presencia de lengüetas proyectándose hacia la luz capilar la presencia de centriolos en las células endoteliales en la rata adulta (Umehara (38)), algunas veces en relación con fibras que se asemejan por su disposición a una base ciliar; Dyer (45), en 1968 observó partículas de glucógeno en células endoteliales de ratas de dos días, y previamente varios autores habían señalado la existencia de vacuolas grasas que las llevó a considerar a la célula endotelial como preadipocito o adipoblasto, si bien hoy podemos interpretar estas vacuolas electrondensas como pequeños lipomicrones que rara vez han sido descritos en la célula endotelial y nunca en el espacio intersticial hasta alcanzar la membrana de la célula grasa (46). En realidad no serían más que un mecanismo de absorción o paso de los quilomicrones desde la luz capilar a la célula grasa, si bien la visualización de estos es extraordinariamente rara, — siendo lo normal que tras la actuación enzimática de la lipoproteinlipasa en la luz capilar los quilomicrones dejan de ser visualizables hasta que alcancen la célula grasa y reaparezcan como pequeñas gotas de lipomicrones.

Toda la red capilar y vascular en general es perfectamente visualizable con técnicas enzimáticas con Fosfatasa alcalina y ATPasa, enzimáticas en los que es rica la célula endotelial (Fig. 3 a,b).

INERVACION

Dubois en 1.896, llegó a la conclusión de que la inervación del tejido adiposo pardo era doble: por un lado fibras de los tractos espinales cervicales y de los 5 primeros segmentos torácicos, y por otro, del sistema simpático ganglionar.

Carlier (48) demostró en el erizo que el tejido adiposo pardo interescapular recibe una discreta inervación del 3º, 4º y 5º nervios intercostales. Sidman y Fawcett (49), demostraron en el ratón, 6 largas terminaciones del tejido adiposo pardo, entrando por la cara ventromedial - en cada lóbulo interescapular, y dado que estas terminaciones se hallaban separadas, pensaron que cada una de ellas podía derivar de los nervios espinales de la región torácica.

Hull y Segall (1.965), demostraron, seccionando el simpático del tejido adiposo pardo, que la grasa parda de la región del cuello recibe fibras simpáticas que pasan rostralmente a lo largo del tronco cervical simpático. Cortando el tronco rostral del ganglio estrellado se encontró retención grasa en los lobulillos cervicales, mientras que eliminando el - ganglio estrellado la retención grasa ocurre en todo el tejido adiposo - pardo cervical y en la mitad anterior del tejido adiposo pardo interescapular. Por tanto, es obvio que la región anterior de este lóbulo recibe fibras simpáticas vía ganglio estrellado.

Aunque en varias ocasiones se han descrito (49) terminaciones parasimpáticas en el tejido adiposo pardo todos los autores están de acuerdo en que el sistema de inervación predominante por fibras del S.N.Simpático. Esto se apoya en varias evidencias como:

- 1) El tejido pardo contiene gran cantidad de transmisores sinápti

cos de tipo norepinefrina.

- 2) La respuesta del tejido a estímulos fisiológicos puede ser en su mayor parte estimulada por la administración de N.E.
- 3) En condiciones en que falta la respuesta fisiológica del tejido adiposo pardo aún se puede obtener un evidente incremento de descarga simpática dentro del tejido.
- 4) La respuesta fisiológica del tejido adiposo pardo, puede ser deprimida administrando agentes bloqueantes ganglionares.

Patrón microscópico: Johanson (52), Hausberger (53), estudiaron la inervación del tejido adiposo pardo y tejido adiposo blanco en el ratón, usando plata y azul de metileno, describiendo fibras nerviosas asociadas a todos los vasos sanguíneos, más abundantes en las arterias que en las venas, y así mismo, la presencia de fibras nerviosas entre los adipocitos pardos que, a microscopía óptica, parecían llegar a la superficie celular. Una descripción similar fue dada por Sidman y Fawcett (49) - con tinciones de plata. Todos estos autores están de acuerdo, en que las terminaciones nerviosas son de tipo simpático.

Fluorescencia histoquímica: Con esta técnica y en el tejido adiposo pardo se evidencian una gran cantidad de fibras nerviosas con una cantidad relativamente alta de Norepinefrina (N.E.) (54, 55 y 56). La concentración de N.E. está en relación directa con el número de terminaciones simpáticas en un tejido, encontrándose también a lo largo de las neuronas adrenérgicas y en alguna extensión de células cromafinas. La determinación de N.E., es posible mediante técnicas de fluorescencia para catecolaminas, y con su empleo puede visualizarse la inervación simpática de los tejidos incluyendo el tejido adiposo pardo. En este órgano y con esta técnica se encontró que las fibras adrenérgicas eran numerosas y se dispo

nian en las paredes de las arterias, arteriolas precapilares y ocasionalmente alrededor de las venas. A mayor aumento se podía observar un fino plexo fibrilar entre los adipocitos. Wirsén (57), sugiere que estas fibras parenquimatosas pueden funcionar indirectamente en el control de la actividad del tejido, por regulación del flujo sanguíneo y permitir el acceso de las hormonas adipoquinéticas a las células.

Wirsén (57), Wirsén y Hamberger (58) aplicaron la técnica de — fluorescencia, este autor (57), incubando el tejido en alta-metil-norepinefrina incrementado con ello, el contenido amónico de las fibras y terminaciones, y así pudieron visualizar finas fibras de naturaleza adrenérgica entre las células del tejido adiposo pardo, imposibles de detectar en el tejido adiposo blanco.

Para algunos autores, la norepinefrina, visualizada con técnicas fluorescentes únicamente se encontraría en las terminaciones nerviosas— (58,59), mientras que para otros (60) alcanzaría el interior de las células grasas, sugieren también que esta catecolamina tendría la función de activar a la Lipasa. Finalmente son varios los autores que describen terminaciones varicosas o "arrosariadas" en las finas fibras parenquimatosas imagen morfológica característica de las terminaciones simpáticas. Todos estos hechos, como imágenes varicosas, presencia de N.E. fluorescencia, — son mucho más evidentes en las terminaciones de ratas aclimatadas al frío.

Microscopía electrónica: En general todos los autores que se — han dedicado a este estudio (61,62 y 63) describen los axones que alcanzan las células grasas como finos y amielínicos, los que inervan capilares pueden recubrirse eventualmente de células de Schwann, siendo que normalmente están desnudos, y por último las ramas más gruesas que alcanzan las arterias inervan directamente la pared vascular, muscular. En todos los casos las mitocondrias axónicas son abundantes, están también presentes vesículas densas a lo largo del axón y en la terminación, identifica

das como vesícula de N.E.

Recientemente Bergmann y cols. (64), en un completo estudio de inervación del tejido adiposo pardo interescapular a M. electrónica, de ratones, ratas y erizos, hace una descripción completa del mismo: Los haces de fibras amielínicas ramificadas a partir de troncos mayores, cuyos diámetros quedan expresados meticulosamente en el trabajo de Flaiss (61) Linck y cols. (62), que llegan desde la cápsula y conjuntivo interlobular, alcanzan los espacios interlobulillares y las arterias a nivel de la adventicia, se ramifican cada vez más finamente en torno de los capilares de los cuales se separan únicamente por una membrana basal. Durante todo este trayecto son amielínicos y se envuelven por citoplasma de las células de Schwann. En el intralobulillar, las finas terminaciones sólo van forradas parcialmente por los elementos de Schwann, hasta que desnudas alcanzan las células grasas, separándose también de estas exclusivamente por la membrana basal celular. A lo largo de su trayecto los axones muestran un axolema con mitocondrias, neurotúbulos y vesículas densas y sólo eventualmente depósitos de glucógeno. En su trayecto final el curso se hace tortuoso o varicoso, aumentando el contenido vesicular en algunos puntos, lugares que se interpretan como puntos sinápticos, que coinciden totalmente con las zonas de mayor brillantez con técnicas de fluorescencia.

Finalmente Derry y cols. (59), estudiando la inervación del tejido adiposo pardo interescapular en ratas inmunosimpatectomizadas, llegan a la conclusión de que existen dos tipos de fibras, ambas de tipo simpático, que inervan al tejido adiposo pardo: Fibras procedentes de largas neuronas y otras de cortas neuronas. El primer grupo — proceda de cuerpos celulares de ganglios intrínsecos, de mayor fluorescencia por su mayor contenido en N.E. y es más abundante; mientras que el segundo tiene la situación opuesta: menos frecuente y con menor fluorescencia por su bajo contenido en N.E.

TEJIDO CONJUNTIVO

Es pobre en elementos celulares, con mayor abundancia de fi -
bras colágenas, en general se dispone en finas láminas que delimitan el
órgano y se introducen entre los lóbulos y lobulillos, tomando el nombre
de septos o tabiques inter e intralobulillares respectivamente, hasta que
en su expresión más fina rodea a los elementos celulares íntimamente se
parándose de ellos sólo por una membrana basal. A lo largo de estas divi
siones el componente celular y las fibras colágenas se van rarefizando, -
mientras que abundan más las fibras reticulares. (Fig. 4)

El componente celular está fundamentalmente formado por escasos
fibroblastos, algunas células cebadas (Fig. 5) y elementos indiferencial -
dos o lipoblastos. Los dos primeros tipos no muestran ningún carácter di
ferencial con los hallados en otras localizaciones conjuntivas, mientras
que los segundos están más sujetos a discusión e interpretación. Se han
descrito cuatro trabajos sobre la presencia de células indiferenciadas en
tre los capilares y los adipocitos pardos, Umahara 1.968, Bargman 1.968,
Sutter 1.969 y Bernard 1.970. Este tipo celular descrito por Bargmann, co
mo un posible linfocito, ha sido interpretado libremente por diferentes -
autores, así Umahara lo describe como un fibroblasto de naturaleza desco
nida y Sutter y Bernard como el elemento precursor del adipocito, sien
do esta última interpretación muy consistente, tanto desde el punto de -
vista de su morfología, como por su topografía, como por la evidencia con
otras técnicas de este tipocelular. Morfológicamente es una pequeña célu
la con características de indiferenciación e inmadurez, núcleo redondeado,
mitocondrias pequeñas y dispersas, retículo rugoso laminar, numerosos ri
bosomas libres y como rasgo diferencial y pequeñas gotas lipídicas cito
plásmicas, Umahara, describe además un área perinuclear conteniendo Golgi
y centriolo, señalando la carencia de membrana basal en torno a estos ele
mentos.

EL PARENQUIMA

Los adipocitos pardos son células poligonales que se distinguen fácilmente de las células del tejido adiposo blanco por su menor tamaño, 25 a 40 micras de diámetro, y por su apariencia multivesicular, y situación nuclear. (Fig. 2).

A microscopía óptica, presentan un núcleo de localización central, de cromatina laxa, que evidencia uno o dos nucleolos bien manifiestos, y que sólo excepcionalmente se presentan en mayor número (Aronson - 1.954, Bazan 1.966, Bowshe 1.960, citados por Robert Smith y Barbara A. Horwitz, 1.969). Su citoplasma es granular, conteniendo numerosas vacuolas lipídicas cuyo tamaño varía, pero siempre más pequeñas que las del tejido adiposo blanco y que no parecen estar rodeadas de membranas limitantes. (Fig. 6).

Ultraestructuralmente, la membrana plasmática se caracteriza - por presentar gran cantidad de invaginaciones y ocasionalmente profundas sinuosidades o bolsas, los ribetes de las invaginaciones tienen un diámetro de 400 a 500 Å, y son consideradas como la expresión morfológica de actividad pinocitótica. Se han descrito (Linck) (1.973, 1974), en el hamster lesiones del tipo tight, gap, y unos puntos de tipo Nexus, mientras que en el ratón y rata, no parece ser absolutamente típicos, aunque desde el punto de vista funcional todos estos animales se ha demostrado (Scheri dan) un acoplamiento eléctrico entre los adipocitos pardos que solo podría explicarse por este tipo de uniones. Se observa también una membrana basal de 200 Å de espesor. (Fig. 7). El citoplasma tiene un fino carácter granular, conteniendo inclusiones lipídicas y numerosos organelos que irán describiendo a continuación. (Fig. 8).

Gotas lipídicas: Su multifocalidad es, junto a la gran cantidad de mitocondrias, una de las características de los adipocitos pardos.

Aparecen como vacuolas vacías o medianamente densas, independientes o parcialmente fusionadas, de un tamaño de 0,2 a 0,4 micras en ratas recién nacidas y un poco mayores en ratas adultas. Las gotas se limitan por los bordes tubulares del retículo endoplásmico liso que encierran casi totalmente a cada vesícula, sugiriendo que el retículo está implicado en la síntesis lipídica; se cree además que esta barrera del sistema vacuolar supone de hecho una barrera física para impedir la coalescencia de todas las gotas en una única vacuola grande. Con frecuencia — también en las cercanías de las inclusiones lipídicas, se sitúan mitocondrias y ribosomas libres.

Las mitocondrias dominan la estructura general del citoplasma (Fig.9). Son muy pleomórficas tanto en su aspecto general, como en la configuración de sus crestas, así como en el tamaño. En general son mayores que las del tejido adiposo blanco, (0,5 micras frente a las 0,3 — del tejido adiposo blanco), lo cual parece implicar una mayor actividad de ésta célula. La estructura interna mitocondrial es compleja, con crestas muy numerosas de 8 a 15/micras según Sutter 1.969. De orientación paralelas entre sí y perpendiculares al eje mayor mitocondrial, estrechamente empaquetada, y que se extienden completamente por la matriz. En el interior de la matriz se encuentran con frecuencia cuerpos electrónicamente densos, interpretados por muchos autores como depósitos residuales de membranas internas incompletas e indiferenciadas (23, 26). A nivel de la membrana interna, utilizando técnicas especiales como tinción negativa o ultrasonidos, es posible ver las partículas elementales, F-1 o de Fernandez Morán, .

El retículo rugoso falta casi siempre o se halla en cantidad mínima (43) (38). El liso, aunque no demasiado abundante está siempre — presente y como ya hemos indicado con situación preferencial en torno — de las gotas lipídicas.

Aparato de Golgi: A partir de los estudios del año 1967 se confirmó la presencia de un aparato de Golgi moderadamente desarrollado, de situación periférica y cuyo sentido funcional específico no se ha interpretado (43) (38).

Los ribosomas libres son numerosos en el citoplasma de las ratas jóvenes y algunas veces y en menor número en ratas adultas (43). Pueden aparecer asociados en polirribosomas, en número de 5 a 10 unidos por un filamento de RNA y alrededor de las gotas lipídicas y próximas a las mitocondrias.

Con morfología también granular y electrodensa encontramos también inclusiones de glucógeno, que pueden adoptar formas en roseta y racimos (Fig. 10). Su presencia también es superior en células de animales jóvenes, pero no por eso puede considerarse raro este paraplasmata en ratas adultas.

La existencia de cuerpos densos de menor tamaño que las mitocondrias, de morfología ligeramente granular y siempre envueltos por membrana llevó a de Duve en 1964 y 66 a interpretarlos como lisosomas primarios que contenían hidrolasas ácidas todavía no funcionantes. Junto a ellos pueden hallarse, con menor frecuencia, otras partículas electrodensas mayores, incluso mayores que las mitocondrias, en cuyo interior pueden encontrarse inclusiones citoplásmicas, restos de organelos y mitocondrias y que han sido repetidamente interpretados como autolisosomas o citolisosomas (38) (Fig. 11). El número de citolisosomas aumenta con la mayor actividad metabólica celular, siendo uno de los momentos más expresivos del nacimiento.

Por último, la presencia de centriolo en el tejido adiposo parado, fué descrito en el tejido interescapular parado del conejo y en murciélagos (38). Este organelo se encuentra cerca del núcleo y asociado a

microtúbulos. La presencia de este centriolo parece indicar, por lo menos, una capacidad de división que con tanta frecuencia se le niega al tejido adiposo pardo, adulto, así como una actividad rectora del hialoplasma durante la interfase. Aquellos autores que niegan la actividad mitótica del tejido adiposo pardo interpretan al centriolo como un resto que permanecería desde la última división sin función celular y a los microtúbulos anexos como también restos del aparato mitótico.

COMPOSICION QUIMICA

Si comparamos los dos tipos de tejido graso las diferencias de su composición química son más cuantitativas que cualitativas (43), por ello sólo comentaremos someramente aquellos componentes que pueden suponer un rasgo diferencial, aunque a veces sólo sea cuantitativo, de la grasa parda, fundamentalmente centrándonos en las fracciones lípidos, - proteínas y dentro de estas las de interés funcional como enzimas y coenzimas así como catecolaminas y glucógeno.

Dentro de la fracción lípidos es de señalar que el componente de FOSFOLÍPIDOS supone del 2 al 4 % del total, mientras que en el tejido blanco sólo llegan a alcanzar el 0,2 % de lípidos totales, este hecho está totalmente de acuerdo con la morfología y la función, indicando que -- el tejido adiposo pardo, es más rico en membranas, sobre todo mitocondriales. Aún más significativa, dentro de los fosfolípidos, es la fracción del ácido fosfático CARNITINA, que se encuentra en alta concentración en el adipocito pardo, mucho mayor que en la célula blanca y en cantidades sólo equiparables a las halladas en corazón. (Este ácido fosfático se encuentre localizado en la membrana interna mitocondrial y sirve como transportador de los ácidos grasos hacia la matriz mitocondrial.(38).

El COLESTEROL también se presenta en cifras superiores en el tejido adiposo pardo que en el tejido adiposo blanco, formando parte estructural de las membranas, siendo mayor su proporción, respecto a fosfolípidos, en la membrana externa mitocondrial que en la interna, proporción que se respeta también en el órgano blanco. Independientemente de este sentido estructural, se ha descrito la presencia de otros lípidos derivados de ciclopentano-perhidrofenantreno como la CORTISONA, DEHIDROCORTISONA y CORTICOSTERONA, el tejido adiposo pardo y no en el tejido adiposo blanco. Su significado sería totalmente funcional y regulador y nunca estructural.

Todos los lípidos enumerados más una mínima fracción de glicolípidos vienen a suponer entre el 10-22 % de los lípidos totales, siendo el resto triglicéridos fundamentalmente y ácidos grasos. Los TRIGLICÉRIDOS, suponen la fracción mas importante del adipocito pardo, entre el 75-90 % de los lípidos totales, y es siempre inferior esta cantidad a la hallada en el tejido adiposo blanco, su localización principal es, naturalmente, a nivel de las gotas citoplásmicas, ocupando un segundo lugar la matriz mitocondrial e hialoplasma coloidal. Los ACIDOS GRASOS, son en valores absolutos más abundantes en el tejido pardo, viniendo a representar un 10 % del total lipídico; pero es sobre todo interesante el hecho de que en este tejido halla un predominio de los Ac. grasos insaturados sobre los saturados. Así el Oleico, Linoleico que respecto al total de ácidos grasos se encuentran en el porcentaje: 30-70 % el Oleico, 10-30 % y el Linoleico y de los saturados el mas abundante es el Palmítico, que se halla en un porcentaje del 30 %. La relación entre la función del adipocito pardo y la alta cantidad de ácidos grasos insaturados no está claramente definida, aunque se ha sugerido (Fawcett y Lyman (38) que este hecho se debe a que los ácidos grasos insaturados y las grasas de ellos resultantes presentan un punto de fusión más bajo, impidiéndose así su solidificación durante el mecanismo de la hibernación.

Podemos esquematizar la fracción lípica en el siguiente cuadro:

Tipo y % de Lípido	Situación	Función	Predominio en:
A) <u>LIPIDOS COMPUESTOS 10 %</u>			
-a) Fosfolípidos (2-4%)	Membrana Cel. Superior en m. interna mitoc.	Estructural	Grasa parda.
-b) Ac.Fosfátidos (Carnitina)	Membrana inter na mitocon- drial.	Transporte de ac.grasos.	Grasa parda
-c) Colesterol	Membrana Cel. Superior en: M.Plasmática y M.extr.mito condrial.	Estructural	Grasa parda
-d) Glucocorticoides	Membrana Plasm. Citoplasma. (ligado a re- ceptores).	Reguladora	Grasa parda
-e) Glicolípidos	Membrana Cel.	Estructurales	Igual
B) <u>LIPIDOS SIMPLES 90 %</u>			
-a) Triglicéridos (80%) Di y Mono-glicéridos.	Citoplasma Gotas Lipídicas.	Almacén y reserva	Grasa blanca
-b) Ácidos grasos (10%)	Citoplasma Matriz mito condrial.		Grasa parda
Saturados: -Palmítico 30%			Grasa blanca
In saturados: -Oleico..... 30-70 % -Linolenico. 10-30 %			Grasa parda

Dentro de las proteínas, excluirémos a todas aquellas estructurales y cuya presencia es común con el tejido adiposo blanco y/o con cualquier otro tipo celular, por lo que nos ceñiremos fundamentalmente a la fracción enzimática que de forma específica interviene en las funciones del tejido adiposo pardo, o que por lo menos tiene un significado cuantitativo importante en el órgano pardo. Para mayor sencillez también las hemos esquematizado en cinco apartados, según criterios funcionales.

I.- Enzimas que actúan en la SINTESIS DE ACIDOS GRASOS.

- 1ª.- Glucosa Kinasa
- 2ª.- Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa.
- 3ª.- Fosfohexosa isomerada.
- 4ª.- Enzimas vía pentosas. (Warburg. Libman-Dickens)
- 5ª.- Enzimas vía Embden-Meyerhoff ó glicolisis anaerobia.
- 6ª.- Acido graso sintetasas (Complejo enzimático que actúa en presencia de NADH, Acetil CoA y Malonil CoA a pH 6,6)

II.- Enzimas que actúan en la SINTESIS DE TRIGLICERIDOS, concretamente en el paso de acidos grasos a triglicéridos.

- Triglicéridos sintetasas. (Complejo multienzimático hecho de Acetil CoA: Sn Glicerol-3-fosfoacilhidrolasa y Acetil CoA: Diglicerido.Acil Transferasa).

III.- Enzimas que actúan en la MOVILIZACION DE TRIGLICERIDOS.

- 1º.- Lipoproteinlipasa. Presente en membrana plasmática y capaz de incorporar al adipocito los ácidos grasos de la ingesta.
- 2º.- Lipasa tisular. Todas ellas de caracter hidrolítico, holoenzimas y capaces de movilizar los triglicéridos
- 3º.- Esterasas Específicas. de las gotas lipídicas, escindiendolos en ac. grasos y glicerina.

IV.- Enzimas que actúan en la OXIDACION DE LOS ACIDOS GRASOS.

- 1º.- Enzimas de la Beta-Oxidación o espiral de Lynen, presentes en la matriz mitocondrial, aunque no es la vía más importante en la degradación grasa en el adipocito pardo.
- 2º.- Tejido adiposo pardo tiokinasa y/o GTP tiokinasa, como mediadores para la formación de Acil CoA.
- 3º.- Enzimas del ciclo de Krebs, tipo decarboxilasa y deshidrogenasa que actuando como apoenzimas necesitan la presencia de coenzimas.
- 4º.- Coenzimas de la cadena respiratoria (Nad, Fad y FMN) Citocromos.

V.- Enzimas relacionadas con la alta VASCULARIZACION DEL TEJIDO ADIPOSEO PARDO.

- Fosfatasa Alcalina
- ATP asa...etc...

Sobre la importancia de cada uno de ellos, su significación funcional y papel concreto en cada vía, haremos comentarios posteriormente en el capítulo de fisiología, o trataremos más directamente aquellos que, por parecernos más importantes para los objetivos de esta tesis, los hemos estudiado personalmente y los comentaremos y expondremos más ampliamente.

Las CATECOLAMINAS juegan un papel fundamental en el Tejido adiposo pardo en los mecanismos de producción de calor, fundamentalmente en los ascensos bruscos de temperatura, como en los Stress, adaptación post-nacimiento o despertar de la hibernación. Se encuentran en concentraciones de 0.5 a 1 mg/gr. de tejido graso pardo.

Ya anteriormente se habían señalado altos niveles de algunas de estas sustancias como la Norepinefrina, Serotonina e Histamina (43). La función de estas catecolaminas, es la de regulación funcional del tejido adiposo pardo, siendo de hecho el principal regulador de este órgano.

Por último merece la pena señalar la presencia de GLUCOGENO en las células del tejido adiposo pardo, en ocasiones en cifras importantes, con función almacenadora y energética. Ha sido demostrado química e histoquímicamente, así como ultraestructuralmente, y su almacenamiento depende de los niveles de insulina, alimentación y denervación, disminuyendo con el ayuno y adrenalina, siguiendo por tanto, en principio, un curso paralelo al depósito de triglicéridos.

CITOFISIOLOGIA

Durante muchos años se creyó que el tejido adiposo pardo tenía muy poca actividad metabólica, pero hoy en día se sabe que la célula adiposa no es un lugar inerte de almacenamiento de grasa, sino que tiene un metabolismo activo y se está renovando continuamente.

Una de las funciones del tejido adiposo pardo, es el almacenamiento de triglicéridos que proceden de dos fuentes fundamentales de la circulación a través de la ingesta y metabolismo graso, y, en segundo lugar, de la síntesis de los mismos a partir de la glucosa. La otra función es la movilización de esos triglicéridos almacenados. En ambas funciones la grasa se asemeja al tejido adiposo blanco, pero lo verdaderamente específico del tejido adiposo pardo, es el aprovechamiento que hace de esa movilización de los triglicéridos obteniendo energía en forma calórica — directamente, hecho que le permite calentar la sangre y contribuir al — mantenimiento de la temperatura en los homeostamos.

I) FUNCION ALMACENADORA DE TRIGLICERIDOS:

Estos triglicéridos

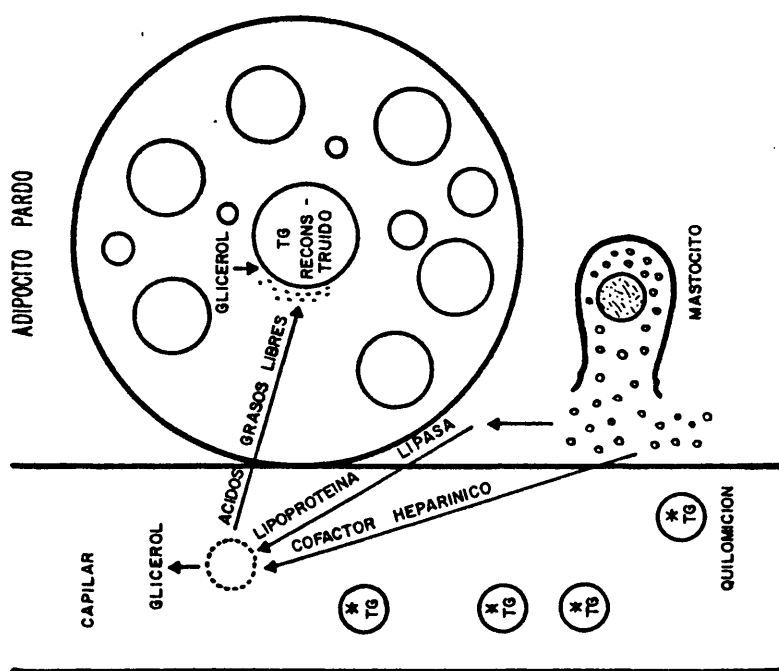
como acabamos de señalar, proceden de dos fuentes:

- a) de la circulación, las grasas que a su través son ofrecidas a los adipocitos tienen a su vez un doble origen, los triglicéridos de la ingesta transportados por la sangre como quilomicrones y los — triglicéridos endógenos, sintetizados por el hígado y vehiculizados por la sangre como lipoproteínas de baja densidad.

Los quilomicrones absorbidos en la pared intestinal pasan desde los enterocitos a la circulación linfática, y de esta a la sanguínea. Al alcanzar la región grasa el quilomicron es degradado, en la pared del ca

pilar, a ácido graso libre y glicerol, por intervención del enzima pro
tein-lipasa, hidrolasa segregada por el adipocito y normalmente ligada
a la membrana plasmática de este, que es capaz de liberarse hasta la -
luz capilar donde realiza su acción hidrolítica. La acción de esta enzi
ma está mediatizada por la heparina liberada desde los mastocitos veci
nos por degranulación, y regulada por la propia ingesta y necesidades -
orgánicas que mediante un mecanismo de retrocontrol estimulan o inhiben
su producción en la célula grasa, observándose que sus niveles varían -
según el estado de nutrición. Una vez que el ácido graso libre atravía
se la membrana del adipocito, este volverá a unirse al glicerol para de
positarse en forma de triglicéridos como "lipomicrones" (66). Desde el
punto de vista funcional la intervención de la proteínlipasa, regulando
el nivel de utilización de triglicéridos de la dieta, está totalmente -
confirmada. E igualmente desde el punto de vista morfológico, puede apre
ciarse como los quilomicrones de los capilares a adyacentes al tejido -
graso, de aspecto electrodenso, desaparecen en su paso a través de la -
célula endotelial y tejido intersticial, para volver a reaparecer, como
lipomicrones electrodensos nuevamente en el citoplasma del adipocito, -
expresando que durante el camino luz capilar-adipocito, dejan de existir
como tales transformándose en ácidos grasos por hidrólisis.(ver esquema
III).

- b) La segunda fuente: por la que la célula grasa es capaz de alma
cenar triglicéridos en su síntesis directa a partir de la glu
cosa que entra en la célula. Aunque en condiciones normales ,
la célula adiposa es impermeable a la glucosa, este paso es -
facilitado por la insulina que incrementa la utilización de
la glucosa por parte del adipocito a medida que este sinteti
za triglicéridos. Aunque no se excluye que la glucosa pueda
penetrar por pinocitosis, sin embargo existen requerimientos
estructurales y funcionales definidos, que confirman que las
células captan la glucosa mediante un mecanismo molecular pro



teico, utilizando receptores de membrana. También es posible que además la insulina aumente la superficie celular para facilitar este movimiento.

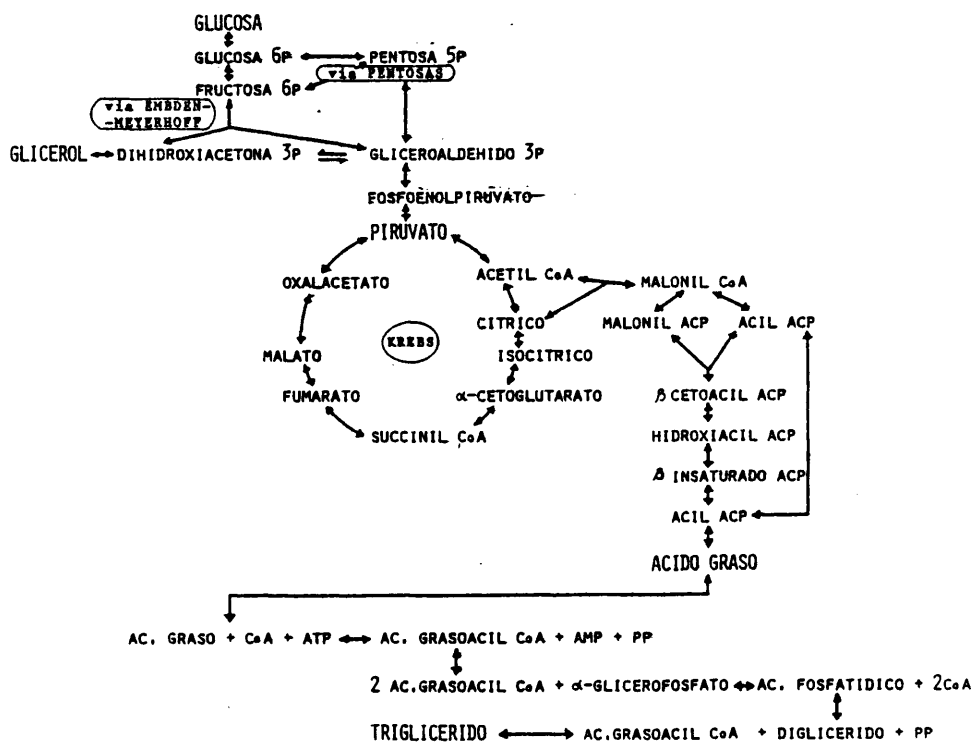
Una vez que la glucosa alcanza el citoplasma celular o bien queda almacenada en forma de glucógeno o es activada por la G-6-P deshidrogenasa pudiendo seguir dos caminos: La vía Glicolítica o de Embden-Mayerhoff, o la vía metabólica de las pentosas. De estas dos vías puede obtenerse piruvato, que entrará en la matriz mitocondrial donde dará - Acetil CoA que podrá ser utilizado energéticamente como sustrato en la posterior síntesis de ácidos grasos y su esterificación (ver esquema IV).

El otro metabolito necesario para esta síntesis es el alfa-glicerol-fosfato. Realmente este metabolito puede ser utilizado por la célula grasa en dos sentidos: Para la esterificación de ácidos grasos, mecanismo en el que glucosa y glicerol compiten, y para la formación de CO_2 y ácidos grasos libres, en donde la glucosa no compete con el glicerol, sino que, por el contrario, facilita su metabolización. El alfa-glicerol-fosfato puede ser obtenido por cinco caminos diferentes:

- Reacción de la transaldolasa ($\text{Fructosa-6-P} + \text{Gliceraldehido-3-P} \rightleftharpoons \text{D-Fructosa}$).
- Por un mecanismo de transfosforilización entre el Glicerol y el Fenilfosfato.
- Por la unión directa de la glicerina con el ácido fosfórico, como sucede en los microsomas. ($\text{Glicerina} + \text{PO}_4\text{H}_3 + \text{Cl}_2\text{Mg}$) pH 5,5 = Alfa-glicero-fosfato.
- Por la intervención de una isomerasa y el NADH_2 sobre la Dihidroxiacetona. ($\text{Dihidroxiacetona} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Alfa-glicerol-P} + \text{NAD}^+$)
- Y finalmente por intervención de la glicerolquinasa. ($\text{Glicerina} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{Alfa-glicerol-fosfato} + \text{ADP}$).

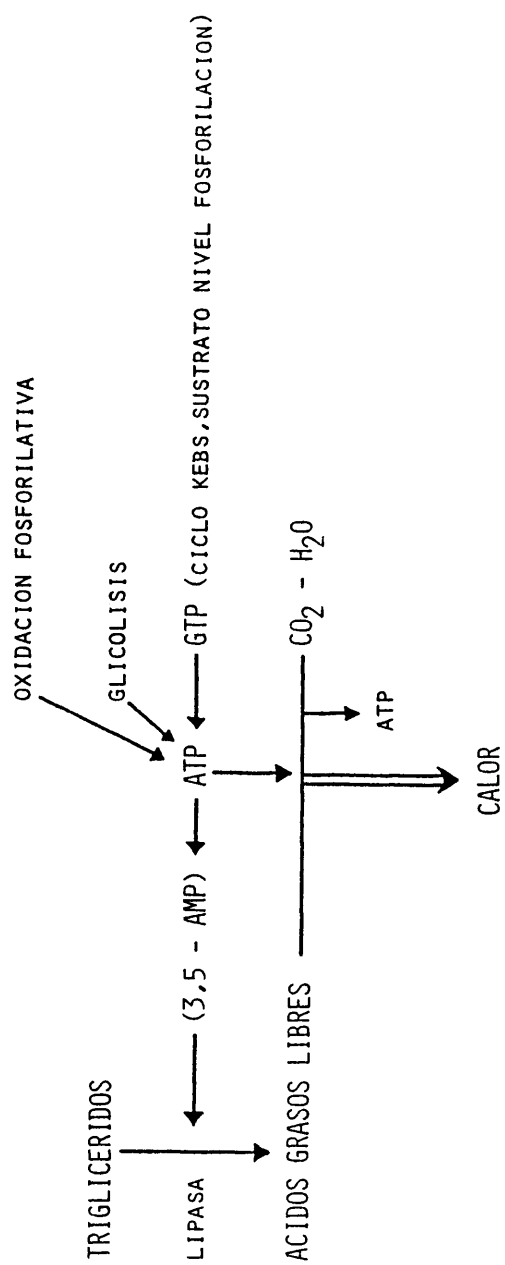
ESQUEMA IV

LIPOGENESIS

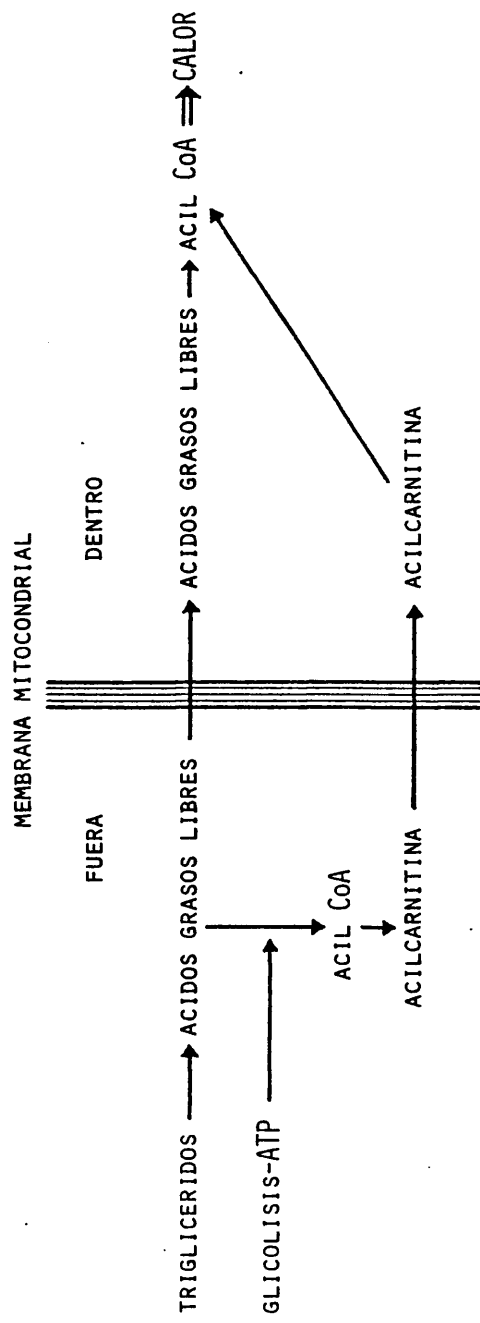


ESQUEMA V

LIPOLISIS



ESQUEMA VI



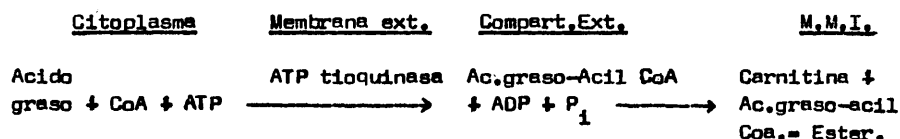
(Tomado de BROWN ADIPOSE TISSUE;1970)

II) LA SEGUNDA FUNCION DEL TAP ES LA MOVILIZACION DE LOS TRIGLICE-
RIDOS ALMACENADOS:

Proceso que ocurre por intervención de las lipasas, capaces de hidrolizar las grasas en glicerol y ácidos grasos libres en el conocido mecanismo de saponificación. Cuando este se realiza en la grasa blanca, los ácidos grasos abandonan la célula y son transportados por la sangre unidos a la albúmina, mientras que en el TAP no abandonan la célula, sino que son utilizados a nivel mitocondrial para la obtención de energía, en parte química pero fundamentalmente calórica, mecanismo específico de este tipo de tejido y en el cual entraremos más detenidamente a continuación. (esquema V).

Los ácidos grasos libres obtenidos por saponificación penetran en la mitocondria a la vez que se unen al Acil CoA, y una vez en la matriz serán degradados por beta oxidación. Para su penetración y oxidación se conocen actualmente dos vías: Una de ellas dependiente de la carnitina y la otra independiente de este ácido fosfático. Como se puede observar - en el esquema VI.

a) Ruta dependiente de la CARNITINA:



Los ácidos grasos, por esta vía, penetran en la mitocondria como esteres de la carnitina. En primer lugar el ácido graso se une al acetilCoA (se piensa que producido en el retículo endoplásmico liso) y por intervención de la ATP tloquinasa situada en membrana y con gasto de ATP atraviesa la membrana externa mitocondrial, alcanzando el comportamiento externo como ac. graso-acil CoA. En un segundo momento y, a nivel de la membrana in

terna mitocondrial, el complejo ac. graso-acil CoA se unirá al lípido — transportador carnitina, con la que formará un compuesto tipo ester y — así, como ester de la carnitina, el ácido graso alcanzará el compartimento interno o matriz.

Esta ruta es muy activa en las mitocondrias del TAP, y para — que se realice es necesario, primero una estructura mitocondrial intacta y segundo la presencia de ATP, ya que cualquier otro nucleótido quedaría inhibido por la actividad de la tíoquinasa (38); e igualmente necesaria, la presencia de carnitina en la membrana interna, fosfatido en el que es muy rico el TAP. (38)

b) Ruta independiente de la CARNITINA.

En comparación con la anterior es menos activa. En este caso los ácidos grasos penetran libremente en la mitocondria y allí son activados y oxidados.



El GTP no actúa directamente sino que se convierte previamente en ATP para la activación de los ácidos grasos, ya que por sí mismo no — puede activarlos como ocurre en el hígado.

Estas dos rutas son capaces de mantener una alta tasa de penetración de ácidos grasos en la matriz mitocondrial y de su oxidación, — además, con independencia de la energía química producida en fosforilización oxidativa. (38)

III) LA TERCERA FUNCION DEL TAP, ES LA PRODUCCION DE ENERGIA:

Que

como antes decíamos, es la única específica de este órgano y la que fundamenta las diferencias fisiológicas y morfológicas entre TAP y TAB. - Respecto a ella caben plantearse las siguientes preguntas:

- 1º.- ¿ Como se produce la energía en el TAP ?
- 2º.- ¿ Que tipo de energía es y en que proporción se produce ?.
- 3º.- ¿ Se obtiene directamente energía térmica o a través de — energía química que luego se transforma ?.
- 4º.- Si este último mecanismo es cierto, ¿ como, donde y cuando se realiza esta transformación ?.
- 5º.- ¿ Como utiliza o libera el adipocito pardo la energía producida ?.
- 6º.- ¿ Que factores controlan la producción y sus mecanismos ?.

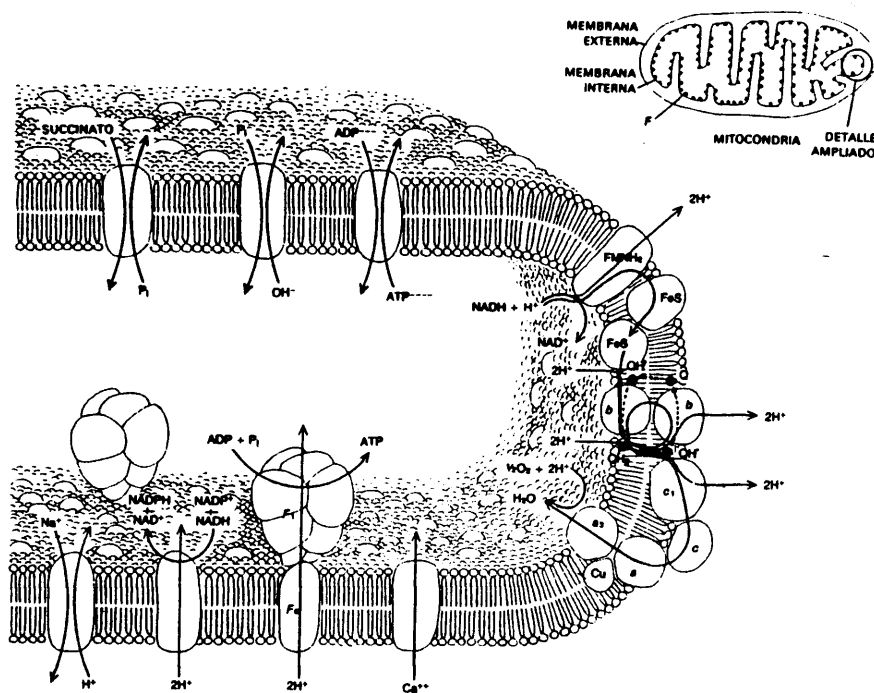
Los substratos a partir de los cuales el adipocito pardo va a obtener la energía, son los ácidos grasos y la glucosa ingerida o — degradada del glucógeno, pero de ambos es la oxidación de los ácidos — grasos la fuente principal de energía en el TAP. La mayor parte de esta energía revierte en forma de calor, pero también es necesario, para que el mecanismo se mantenga, que se produzca ATP o su equivalente GTP, que se consumirán en la propia activación de la lipólisis y de los ácidos — grasos.

La oxidación de los ácidos grasos se realiza en la matriz mitocondrial, siguiendo la llamada beta oxidación o espiral de Linen mediante la cual por cada vuelta de espiral, además de dos hidrógenos, se liberará un Acetil CoA que entrará en el ciclo de Krebs, repitiéndose el proceso hasta la total consumición del ácido graso.

Por su parte la glucosa primero se degrada en el citoplasma en glicolisis anaerobia hasta la obtención de piruvico, vía en la que se obtendrán 2 moléculas de ATP por cada una de glucosa (ó 3 ATP si partimos del glucógeno). El pirúvico obtenido por esta vía entra en la matriz mitocondrial donde, con el gasto de un ATP, se transformará en Acetil CoA, que al igual que el procedente de la beta oxidación de los ácidos grasos entrará en el ciclo de Krebs, donde los sucesivos substratos serán degradados hasta la obtención de CO_2 y H_2O por sucesivas decarboxilaciones y dehidrogenaciones, mientras que se producen 12 ATP. Uno de ellos, dírectamente en forma de GTP en el paso de fosforilización del Succinil-CoA, y el resto en colaboración con la membrana interna mitocondrial.

Así pues, podemos esquematizar diciendo que la energía química la obtiene el adipocito pardo en tres momentos: Glicolisis anaerobia del glucógeno o glucosa, fosforilización del Succinil CoA en el ciclo de — Krebs y por último por mecanismos de fosforilización oxidativa ocurridos en la membrana interna mitocondrial, siendo los dos primeros mecanismos de baja producción frente al último, y este no solo más productivo cuantitativamente sino, además, el de elección para otras formas de energía también.

Los hidrógenos liberados en la matriz mitocondrial, procedentes tanto de la espiral de Linen como de ciclo de Krebs, son transportados — por el coenzima aceptor (FADH o NADH) a la membrana interna mitocondrial y, como sucede en cualquier otra célula, serán ionizados en protones que salen fuera al compartimento externo y electrones, que vehiculizados — por las proteínas sulfuradas y los citocromos, Ubiquinona o Q, b, c_1 , c, a y a_3 , revertirán nuevamente en la matriz mitocondrial donde uniéndose a dos protones y a media molécula de oxígeno ionizado darán una de agua. En el transcurrir de los electrones por la membrana interna mitocondrial se aproximan, por la disposición topográfica de los citocromos, dos veces al medio interno o matriz tomando 4 protones en total y otras dos veces al

ESQUEMA VII

MEMBRANA MITOCONDRIAL (Tomado de V. HINKLE.- Investigación y Ciencia
Mayo 1.978)

compartimento externo liberándolos, es decir que si a estos 4 protones les sumamos los dos productos de la ionización del hidrógeno primitivo, el balance final son 6 protones o hidrogeniones liberados al compartimento externo, como puede verse en el(esquema VII). Dado que la concentración de protones es superior en el compartimento externo que en el interno, estos 6 protones están dispuestos a volver a atravesar la membrana - interna mitocondrial "a favor de corriente", es decir, liberando una energía, o bien a quedarse en el compartimento externo con la energía acumulada que podrán desplegar en cualquier otro proceso, siempre que las condiciones les sean favorables.

En las mitocondrias de cualquier célula, el paso de los protones se realiza a través del complejo $F_1 - F_0$ y la energía liberada la utiliza la partícula F_1 o partícula de Fernandez Moran en la reacción - $ADP + P_i = ATP$, gracias a su riqueza en ATP-Kinasa, en el mecanismo conocido con el nombre de Fosforilización oxidativa. Por cada dos protones - que entran se forma una molécula de ATP.

En condiciones normales el transporte de electrones, o respiración, y la fosforilización oxidativa están totalmente acoplados, de tal manera que podemos decir que por cada pareja de electrones que circulan por la membrana interna se forman 3 ATP.

La fundamental diferencia entre el mecanismo del TAP y el resta de células está, en que mientras que en estas, respiración y fosforilización oxidativa están totalmente acopladas, en el TAP no existe tal acouplamiento o por lo menos no es total. De tal forma que el balance en la producción de ATP es muy inferior al de cualquier otra célula, y la diferencia se manifestará como energía acumulada en la vía respiratoria - que posteriormente se expresará como escape calórico.

Aunque el mecanismo de desacoplamiento mitocondrial del tejido adiposo pardo ha sido estudiado por varios autores, como Janký (68,69) Smith y cols. (70,43) Prussiner y cols. (71), Nicholls (72), Christiansen y cols (73,74) y Flatmark y Pedersen (75), podemos decir que toda vía en la actualidad nos es desconocido en gran parte.

El interés de la mayor parte de los autores se ha orientado - fundamentalmente a dilucidar el mecanismo de acoplamiento y función mitocondrial; es decir, la dependencia de estas funciones de determinados factores como: nivel mitocondrial de nucleótidos, fósforo inorgánico, hidrogeniones, potasio, NADH, etc., así como al estudio de aquellas sustancias que por actuar modificando estos factores, son capaces de - alterar la actividad energética mitocondrial, es decir, que concretamente en las mitocondrias del tejido adiposo pardo podrían actuar como desacoplantes o reacoplantes.

Flatmark y Pedersen hacen un estudio comparativo del estado de estos factores en mitocondrias desacopladas como las del TAP y acopladas como las del hígado, y del papel de diversas sustancias desacoplantes o reacoplantes en ellas, utilizando como medidor la activación del citocromo b, frente a otras medidas también empleadas en la literatura como consumo de oxígeno, colorantes fluorescentes, nivel de fosforilización de - ATP, estado iónico.... etc. De este y otros (68-75) trabajos, podemos - esquematizar las siguientes dependencias funcionales:

- a) Dependencia del nivel de nucleótidos de adenina, del ADP/ATP y de la traslocación de los mismos.

La presencia o adición de nucleótidos de la Adenina va acompañada de una disminución en la tasa de disposición de energía endógena, es decir, que estos nucleótidos tienen un efecto acoplante. Así en mitocondrias con total acoplamiento el ratio ATP/ADP es de 4,0, como sucede en el hígado, mientras que en las mitocondrias del TAP, este ratio es -

de 0,13, que equivaldría a un potencial de fosforilización de 90 Kilo-calorías/mol.

Esta acción energizante de los nucleótidos, no es específica de los nucleótidos de adenina, sino que también la realiza el GDP, el GTP y en cobaya se ha demostrado la misma acción con otros nucleótidos variados como: ITP, UTP y CTP.

Se ha demostrado que esta acción se realiza a nivel membrana interna, alternando su permeabilidad. Los efectos acoplantes de los nucleótidos no son inhibidos por la Oligomicina ni atractilato, lo cual indica que ejercen su acción en una región citosólica de la membrana, - pero sin embargo son sensibles al FCCP, sugiriendo que los nucleótidos inducen a un cambio electroquímico, alterando la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna a los protones. Dado que no es posible que los nucleótidos alteren la permeabilidad de la membrana "per se", también se arguye que su acción primaria sería la movilización de los ácidos grasos desacoplantes, los cuales alterarían la permeabilidad al movilizarse. Toda vez que en las mitocondrias del TAP el nivel de ácidos grasos y de AcilCoA es muy alto y baja la tasa de nucleótidos, las condiciones para un desacoplamiento son óptimas.

b) Dependencia de la concentración de fósforo inorgánico y ortofosfatos

Las mitocondrias del TAP, presentan un bajo contenido de Pi almacenado, pero no por falta de permeabilidad sino porque parece ser, que únicamente alcanzan el nivel intramitocondrial aquel fósforo inorgánico que vaya a utilizar impidiéndose el almacenamiento, hechos que se han demostrado mediante el empleo de ionóforos dependientes o no dependientes de fosfatos.

Se interpreta que esta disminución en P_i es otro de los causantes de la baja capacidad energizante de las de mitocondrias del TAP.

El acúmulo del P_i solo se puede conseguir removiendo o traslocando los ácidos grasos y/o los derivados de AcetilCoA, que elevarían el nivel de acumulación hasta valores superponibles a los hallados en mitocondrias altamente energizadas como las del hígado.

c) Dependencia de la permeabilidad de protones.

Las membranas de mitocondrias acopladas, como las de los hepatocitos, son normalmente impermeables a cualquier ion hidrofílico, preferentemente a protones, mientras que las acopladas, como las del TAP, son con normalidad muy permeables a los protones, con permeabilidad de tipo pasivo. Hasta el punto, que puede decirse que cuanto están totalmente denenergizadas, como en la exposición al frío, el gradiente de protones es igual a 0, o por lo menos bajísimo. En estas circunstancias el pH intramitocondrial medido a nivel de matriz, es igual a 0,04, situación inversa a las de las mitocondrias del hígado cuyo pH es de 1,2.

De cualquier forma la permeabilidad de protones en las mitocondrias del TAP, no se modifica por variaciones del pH del medio, y sí por la presencia de albúmina sérica y de nucleótidos de la purina.

d) Dependencia del ion potasio.

La energización de la mitocondria depende también de la concentración de K^+ , de forma que en las mitocondrias del TAP, la concentración de K es baja y alta en las mitocondrias acopladas del hígado. - Reed y Fair (76) demuestran que la movilización de triglicéridos causa pérdida de potasio en la bomba mitocondrial.

e) Dependencia del NADH y otros aceptores de hidrógeno.

El nivel respiratorio de cualquier mitocondria está ligado a la concentración de coenzimas aceptores de hidrógeno mitocondriales, generalmente flavínicos o NADH bien en estado libre o ligados a substratos. Las concentraciones de estos son superiores siempre en mitocondrias que funcionan en acoplamiento que en aquellas desacopladas, y su adición y presencia puede considerarse también como un factor de acoplamiento.

Ahora bien, aunque los estudios en este sentido han sido fructíferos, también podemos decir que los mecanismos íntimos de desacoplamiento y los lugares concretos donde este se ejerce, son aún desconocidos.

Se viene considerando que la mayor parte de los autores (68-75) que los más importantes desacoplantes en el tejido adiposo pardo son precisamente los ácidos grasos y/o el AcilCoA y sus derivados, y dentro de los ácidos grasos aquellos de cadena larga $C_{12} - C_{18}$ e insaturados; — para algunos de esos autores estos ácidos grasos, serían obligatoriamente de naturaleza endógena, mientras que para otros serían siempre exógenos. Se piensa que estos ácidos grasos, elevados cuantitativamente, — se fijarían a lugares concretos de la membrana mitocondrial interna, correspondientes a aquellos lugares señalados hipotéticamente como lugares de desacoplamiento. Pero junto a ello también se ha señalado que el desacoplamiento también podría producirse por la misma movilización lipídica desde unos territorios mitocondriales a otros. Bien tras fijación en puntos activos o no, su mecanismo de acción consistiría en modificar todos los factores antes señalados como reguladores de la función mitocondrial con acoplamiento, como concentración de ATP, permeabilidad iónica... etc. Es decir que su función desacoplante la podemos medir estudiando factores como: Caída del consumo de oxígeno, ratio P/O, relación ATP/ADP, Bajo nivel de ATP, NADH y succinatos...etc., en último extremo podríamos decir que actuando como conductores de protones desacoplarían funcionalmente —

la mitocondria, aumentando la energía de disipación calórica.

Otro tipo de sustancias desacoplates como Albúmina, Carnitina, Catecolaminas y factores lipolíticos, descritas en la literatura, - ejercian su acción a través de un incremento en la permeabilidad y concentracion de los ácidos grasos y/o AcilCoA. Frente a estos, otro gran - grupo de variadas sustancias, tendrían una acción concreta y no mediatizada por los ácidos grasos, como por ejemplo la Valina o la Nigericina que inhiben la permeabilidad del potasio, o el FCCP (Carbonil, cianuroperatrifluorometoxifenilhidrazona) que disminuiría la concentración de nucleótidos y la permeabilidad de protones o potencial electroquímico.

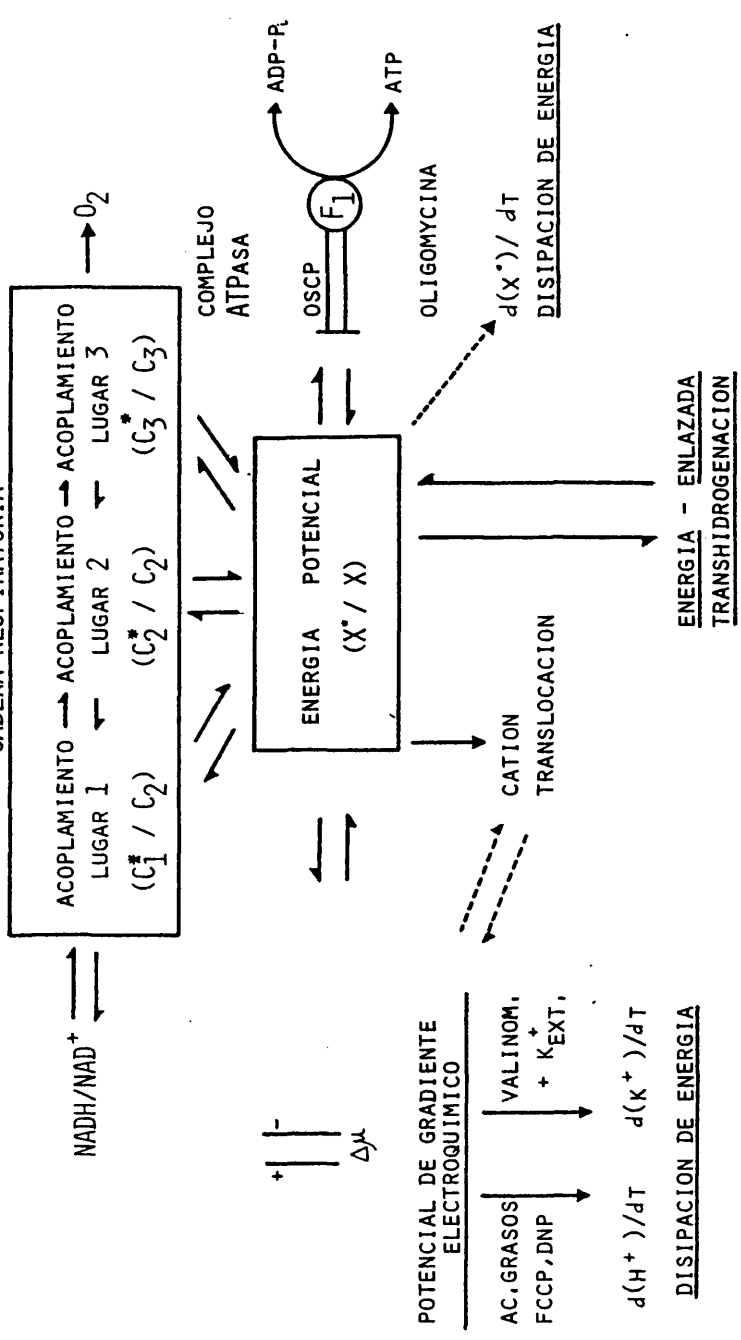
De todo ello puede deducirse que las sustancias con función - desacoplante que hoy se conocen son muchas y muy variadas. Todas tendrían en común el que actuarían sobre uno, o varios, de los factores regulantes de la producción energética mitocondrial, siendo además de señalar que en el caso de tejido adiposo, tomarían especial significado en este sentido los propios ácidos grasos.

En otro sentido podemos deducir también, que los ácidos grasos que ingresan en la mitocondria se distribuyen de dos formas:

- a) una parte destinada a sustrato de la beta oxidacion y
- b) otra parte, presumiblemente aún mayor, utilizada como factor - desacoplante bien ligándose a lípidos endógenos y/o a lugares activos, o simplemente movilizándose, pero siempre bloqueados como sustratos.

Flatman y Pederson en su trabajo de recopilación y como ellos otros autores, consideran el desacoplamiento de acuerdo con la hipótesis conformacional de Boyer, (77) considerando que a nivel de la membrana - interna mitocondrial y de la cadena respiratoria habría tres lugares de

CADENA RESPIRATORIA



REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LAS RUTAS DE TRANSFERENCIA DE ENERGIA EN LA MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA

signados como 1, 2 y 3, de acoplamiento, cada uno de los cuales estaría formado por una proteína o complejo proteico transferidor de electrones que alternativamente pasaría de la postura C inactiva a la C' o activa vada durante la transferencia; si bien no sabemos cuales de las proteínas de la cadena respiratoria corresponden a estos puntos.

En cualquiera de estos lugares de la cadena respiratoria, la energía puede quedar "almacenada", mediante un cambio configuracional - protéico, o bien ser transformada en energía "química" (ATP) al transferirse al sistema de ATP-asas de las partículas F_1 o elementales; teniendo que haber siempre un equilibrio entre las dos formas de energía (potencial de energía).

La energía así producida puede ser utilizada en procesos endoenergéticos, por la misma mitocondria, como: Síntesis de ATP, transporte de cationes, génesis de un gradiente de potencial eléctrico o transhidrogenaciones energizadas, o bien por procesos exoenergéticos como disipación de energía calorífica, tal y como se expresa en el esquema VIII:

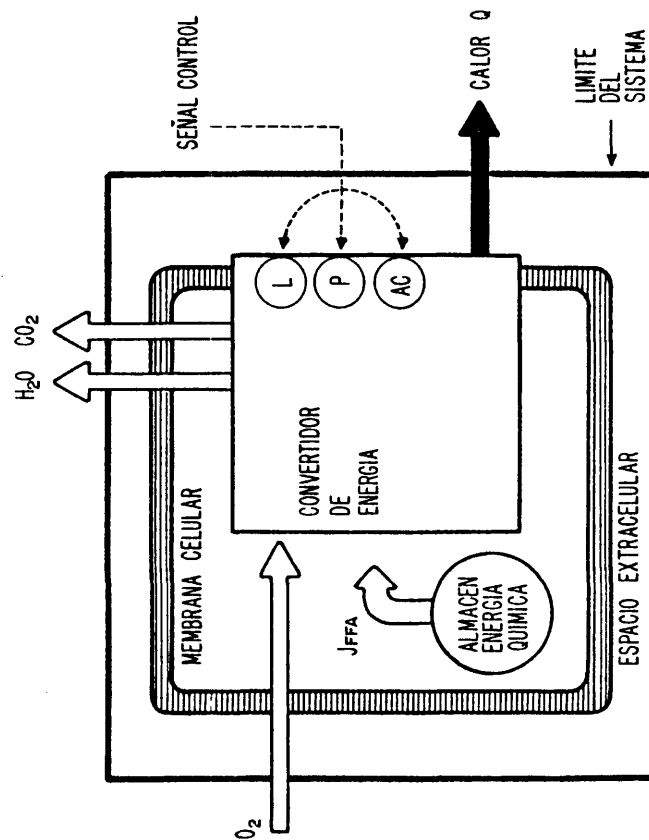
Cualquier mecanismo o sustancia química que equilibre el nivel de H^+ , a través de la membrana mitocondrial colapsará el gradiente de potencial electroquímico y la energía liberada, tanto desde el almacén de la cadena respiratoria como por hidrólisis de ATP, será liberada en forma de calor. Este tipo de sustancias se vienen definiendo como desacoplantes y al mecanismo de desviación energética hacia la forma calorífica se le llama desacoplamiento.

Por último, además de la producción energética realizada a nivel citoplásmico (glicolisis anaerobia) y a nivel mitocondrial (respiración y fosforilización) en desacoplamiento, el TAP tiene una tercera fuente de producción de energía a nivel de la membrana plasmática.

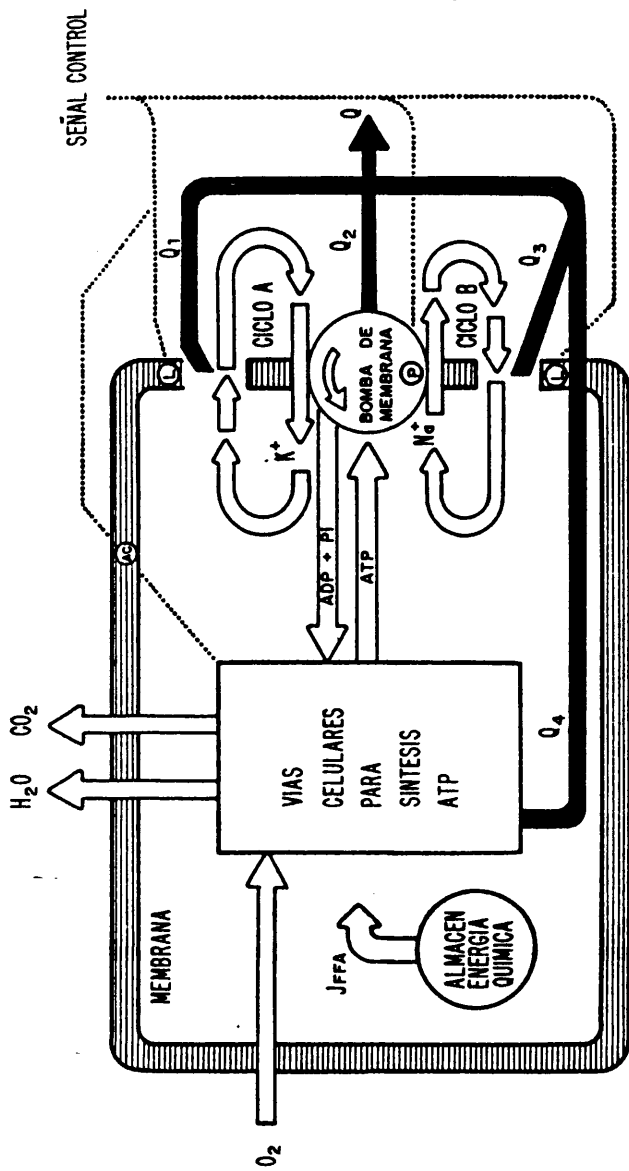
En la mayoría de los tejidos la función de la bomba Na/K de membrana es mantener las concentraciones iónicas, utilizando en forma de trabajo el ATP y solo una pequeña parte de energía se pierde en forma de calor. Por el contrario en el T.A.P., el proceso, aunque el mismo, es mucho más intenso y por ello el escape calórico mucho mayor; de forma que la mayor parte del ATP utilizado en la bomba se libera en forma de calor, utilizándose una menor cantidad en trabajo para el transporte iónico. Es decir, que en este tipo de tejido la principal función de la bomba Na/K de membrana es la producción y disipación calórica.

Este cambio en la dirección de aprovechamiento del ATP en la membrana plasmática del adipocito pardo está motivado por un desajuste iónico, que ha sido demostrado por diferentes autores, tanto en condiciones fisiológicas del TAP, como experimentalmente mediante la adición de sustancias de acción contraria. Así: Girardier y cols, en 1.968, observaron que estimulando el adipocito pardo con N.E., se modificaban las concentraciones de Na y K en el sentido de incrementarse su permeabilidad. Este mismo efecto de aumento de la permeabilidad iónica, fué descrito por estos y otros autores (78-79) durante la termogénesis, en la que, de forma fisiológica, el adipocito pardo es estimulado por la N.E. En ambas circunstancias mejora el flujo iónico, aumentando la entrada pasiva de Na y la salida de K, que secundariamente provocaría un mayor funcionamiento de la bomba y del trabajo requerido en la vuelta a su lugar de origen de estos iones. En cualquier caso, después de pocos minutos de la adición de N.E. las concentraciones iónicas vuelven a nivel de reposo, recuperándose el potencial de membrana (79-80). El efecto contrario fué puesto de manifiesto por Horwitz (81), mediante la adición de Oubaina, inhibidor de la bomba Na/K, capaz de bloquear en el 60 % el efecto de la N.E.

ESQUEMA IX



(Tomado de HOROWITZ y PLANT - Am. J. Physiol. 235 (3): R121-R129: 1.978)



65

ESQUEMA X

(Tosada de HOROWITZ y PLANT - Am. J. Physiol. 235 (3): R121-R129; 1.978)

Podemos considerar, por tanto, que a nivel de membrana plasmática está la tercera fuente de calor del adipocito pardo, en el mecanismo: ATP/Trabajo con alto escape calórico.

Esta producción calórica que acabamos de describir ha sido recientemente interpretada termodinámicamente por (Horowitz 1978), en su trabajo, formulando modelos termodinámicos en los cuales la célula del TAP se considera como un "CONVERTIDOR ENERGETICO". La secuencia de sucesos celulares, como se puede ver en los esquemas IX y X, está controlada por señales del Sistema Nervioso Simpático a través de catecolaminas, en cuya interpretación más adelante nos adentraremos.

En el ESQUEMA IX, el límite cierra la unidad funcional del tejido (adipocito + espacio extracelular). La difusión del O_2 sobre el límite del sistema abierto (sale fuera del sistema). Los ácidos grasos derivados de las vacuolas grasas son la energía que se introduce en el transformador celular. Cuando termina la transformación se libera: CO_2 , H_2O y calor. El flujo de calor atraviesa el límite del sistema y vasos capilares. Por tanto el flujo de O_2 , CO_2 y calor está asociado a la oxidación de ácidos grasos: $O_2 + A.graso \rightarrow CO_2 + H_2O + Calor$. Todo esto está de acuerdo con la conversión de energía química en otras formas de energía que sigue la primera ley de termodinámica.

Ahora este modelo lo vamos a desarrollar en el ESQUEMA X, términos de un sistema no isotérmico bajo condiciones constantes usando redes termodinámicas, las rutas simuladas incluyen la síntesis de ATP - mitocondrial, la bomba Na/K de la membrana y la difusión iónica a través de la membrana del adipocito, en lo que llamaremos "TRANSFORMADOR SECUENCIAL".

- a.- Liberación de ac. grasos para ser oxidados en las mitocondrias. Comprende la entrada de O_2 y la salida primaria de ATP y utilización de ATP \rightarrow AMP en la lipólisis.

b.- Utilización de los ac. grasos para la mitocondria para la síntesis de ATP y conversión de energía química acumulada al sistema Redox.

c.- El nivel de síntesis de ATP depende en parte de las demandas de la bomba Na/K de la membrana. Aquí al utilizar ATP hay una transformación de una parte de energía química en trabajo para el transporte iónico y conversión de otra parte de la energía química en calor.

d.- El último componente es el escape de iones a través de la membrana que pueden modificar los niveles iónicos, que serán compensados por el aumento de función de la bomba Na/K.

De todo esto se desprende que la producción de calor total es la suma de las producciones individuales, pero íntimamente relacionadas,

$$Q_4 + Q_3 + Q_2 + Q_1 = Q.$$

La regulación del transformador está asociada a 3 hechos que ocurren en la membrana:

- 1.- Aumento de la permeabilidad. Se sabe que aumenta la conductividad tras la inyección de N.E., además el aumento de flujo de K^{42} medido "in vitro" y el cambio de potencial de la membrana indica un movimiento alterado de algunas partículas cargadas a través de la membrana.
- 2.- La N.E. estimula la adenilciclase (AC) que cataliza la síntesis de AMP que va a promover la activación de la hormona lipasa ca paz de lipólisis.
- 3.- La N.E. estimula la bomba Na/K por mecanismos. Vía estimulación de un cambio en las concentraciones iónicas intracelulares (es

cape iones) y vía incremento AMP_c a través de la adenilciclase:

Con lo expuesto hasta el momento, podemos contestar a la mayor parte de las preguntas planteadas en principio.

1ª.- La energía producida en último término en el TAP es fundamentalmente calórica y en menor proporción química. Al revés que en cualquier célula la producción de calor es del 90 % frente al 10 % de ATP o GTP.

2ª.- Ahora bien, esta energía calorífica no es producida en su totalidad directamente, sino que en parte se debe a una transformación de ATP en calor, es decir, que en este sentido la célula funciona como un "convertidor energético".

3ª.- Las fuentes energéticas son tres: Citoplásmica, mitocondrial y bomba Na/K en membrana plasmática, cada una con sus peculiaridades respecto a otras células.

Así a nivel citoplásmico la producción energética es superior a la de cualquier célula, su producción es fundamentalmente en forma de ATP que después se convierten en calor.

A nivel mitocondrial los especiales mecanismos de desacoplamiento hacen que se invierta la proporción energética, respecto a las mitocondrias de las otras células, a favor de producción calórica, pero también parte del ATP producido puede ser convertido o desviado posteriormente hacia calor.

Y a nivel de membrana plasmática la energía química es transformada primero en trabajo de transporte iónico, pero principalmente en disposición calorífica.

4ª.- En cualquiera de las fuentes citadas vemos que los mecanismos por los cuales se produce la energía, son esencialmente iguales a los que suceden en cualquier otra célula: Glicolisis - anaerobia, oxidación de ácidos grasos, transporte iónico..etc. pero de tal manera "acondicionados" o modificados que hacen — desviar el balance de producción de energía hacia la forma de calor.

5ª.- Por último, hay que entender también que una parte de la energía producida como ATP se conservaría como tal y, sin transformarse a calor, sería utilizada por el propio adipocito para su mantenimiento funcional, incluso en la propia activación de ácidos grasos, transporte de los mismos... etc.

6ª.- Finalmente con los datos expuestos podemos contestar, aunque — solo sea parcialmente, a la pregunta sobre los controles de — estos mecanismos.

Como ha podido observarse los propios factores comprometidos en las funciones energéticas del TAP, se comportan como reguladores intimos de las mismas. Así el nivel de NADH citoplásmico y de enzimas intrínsecos en la glicolisis anaerobia controlan esta vía energética. Los factores de desacoplamiento y reacoplamiento, como nivel de ATP, P_i, O₂, propios ácidos grasos... etc., controlan la función mitocondrial del TAP.

Pero sobre todos estos factores existen otros, extrínsecos — al adipocito, capaces de regular en último término la función termogénica del TAP, de carácter hormonal y nervioso fundamentalmente, y en cuya descripción entraremos a continuación.



ESQUEMA XII

Regulación nerviosa y hormonal del TAP y su función termogénica.

Para poder responder a esta pregunta, comenzaremos por exponer el esquema de Horowitz y Plant (1978):

El mecanismo integrador del Sistema nervioso autónomo es el hipotálamo, localizado en el centro de la encrucijada del llamado sistema límbico o visceral, y que contribuye al control del funcionamiento visceral de los vertebrados, ejerciendo un doble control nervioso y endocrino. Así pues el hipotálamo es el principal centro regulador de la temperatura, junto con el resto de funciones vegetativas y recibiendo información acerca de la temperatura corporal regula la producción y conservación del calor.

Los centros termosensitivos del hipotálamo están localizados en áreas rostral y caudal. De ellos, los núcleos rostrales -circundantes al supraóptico y paraventricular- regulan la disipación de calor, mientras que los caudales, su generación y conservación.

El estímulo que normalmente activa estas áreas es el enfriamiento o calentamiento de la sangre que irriga el hipotálamo; ante altas temperaturas, entran en función los centros rostrales y con temperaturas bajas sanguíneas los caudales. Pero este mismo efecto puede conseguirse variando directamente la temperatura del hipotálamo o, por vía periférica, ante las sensaciones de calor y frío.

El Sistema nervioso simpático, es el efector primario mediante la liberación de Catecolaminas (Adrenalina, Noradrenalina, Isopropilnoradrenalina a nivel periférico, además de otras que, como el GABA, — actúan a nivel central) que liberadas de las terminaciones nerviosas simpáticas conducirían a la elevación de la temperatura con producción de calor y conservación del mismo; mientras que la disminución de es —

tas sustancias o, la liberación de sus "antagonistas", conllevaría - a una disipación del calor. Ello mediante la estimulación de aquellos órganos comprometidos con la termogénesis, órganos efectores, de naturaleza e importancia distinta según los animales. En los vertebrados este sistema efector los componen principalmente: sistema vascular, - pilomotriz, sudorífero, órganos metabólicos como el tejido adiposo, - muscular, intestinal.... etc., e incluso el comportamiento del animal.

En la adaptación al frío, para producir y conservar el calor, estos órganos efectores realizan funciones como: vasoconstricción disminución de la sudoración, creación de cámaras de aire subpilosas, incluso comportamientos especiales "en busca de lugares cálidos" que en su máxima expresión supondrían las emigraciones, y por último, produciendo un incremento del metabolismo por estimulación de distintos - órganos como son:

- a) para la producción de calor a corto plazo, estimulación - del tejido muscular con la consecuencia de contracciones - liberadoras de energía, mecanismo conocido como termogénesis temblorosa;
- b) producción de calor a mayor plazo estimulando el tejido - adiposo que liberaría una mayor cantidad de ácidos grasos - o combustible;
- c) un tercer sistema a largo plazo implicaría excitación del - eje Hipotálamo-Adrenal-Tiroideo, cuyo resultado sería un - incremento global de la actividad metabólica de la mayoría de los tejidos orgánicos. Si las demandas no son extremas, tal metabolismo podría incrementarse indefinidamente.

En circunstancias especiales, como en recién nacidos, animales hibernantes, o en aquellos equipados de TAP durante toda su vida, este órgano puede realizar una alta producción energética contribuyendo al - mantenimiento de la temperatura corporal (por caminos no temblorosos),

a alcanzar la temperatura de neutralidad adulta en el recién nacido, o a despertar de la hibernación. Todo ello gracias a su especial condicionamiento para la producción de calor, que hace a estas células capaces de una termogénesis más efectiva que el resto de los tejidos citados, - razón por la cual se las viene considerando como "verdaderos hornos calorígenos".

La actividad opuesta: "disipación de calor o enfriamiento corporal" se realiza fundamentalmente a través de: Vasodilatación, sudoración, polipnea y jadeo, disminución del metabolismo en diferentes órganos, y comportamientos animales "en busca de lugares fríos" o entrando en hibernación. Predominando unas u otras respuestas según el animal, - así la polipnea y jadeo en el perro, la sudoración en el hombre... etc.

Como se ve la mayor parte de los órganos comprometidos en la termoregulación son comunes para la adaptación al frío o al calor y sus respuestas opuestas. Esto se viene explicando por la presencia de dos - tipos de receptores o aceptores Alfa y Beta, cuyo comportamiento se interpreta de dos formas diferentes:

- 1) Las catecolaminas (E; N.E.; y I.N.E.) estimularían con diferente signo al órgano efector según se uniesen a receptores Alfa y Beta. Si la unión se realiza en un receptor Alfa, causarían excitación del músculo liso con vasoconstricción, aumento de la actividad metabólica, contracción esquelética, etc, y viceversa si la unión se realiza en receptores Beta. Esto explicaría acciones paradójicas de las catecolaminas en algunos órganos, en los que los tipos de receptores serían opuestos a los habituales.
- 2) Sin embargo, actualmente se vienen considerando que las catecolaminas no funcionarían como un único neurotransmisor de acción distinta dependiendo del aceptor, sino que -

cada una de ellas tendría su aceptor y acción específica, así la N.E., sería Alfa excitante específico, la isoprenalina es Beta excitante específico, mientras que la epinefrina pueda excitar ambos receptores Alfa y Beta.

En el caso concreto de la N.E. más estudiada, se considera que se uniría al receptor de membrana, o locus de la membrana cargado negativamente y capaz de atraer el amonio de la N.E. cargado positivamente, es posible que este locus no sea otra cosa que el fosfato del ATP, formando el complejo ATP-N.E., capaz de estimular a la membrana químicamente a través de la adenilciclase, o eléctricamente despolarizándola, a la vez que neutraliza el neurotransmisor.

Como vemos el tejido graso pardo, en esta panorámica compleja - de termogénesis, está comprometido muy especialmente dentro de vías metabólicas y principalmente en el periodo de recién nacido en un gran número de animales, entre ellos el hombre, y de manera más particular en animales hibernantes durante el despertar del sueño invernal.

Su acción calorífica está controlada por:

- a) Receptores térmicos, como piel, médula espinal, sus señales son transmitidas al SNC concretamente al hipotálamo.
- b) Centros hipotalámicos, que actuarían a través de c y d.
- c) S.N.S., a través de catecolaminas capaces de estimular directamente al adipocito pardo, produciendo lipólisis y aprovechamiento energético de los ácidos grasos.
- d) Eje adrenal-tiroideo, que mediante la liberación de diferentes hormonas: Epinefrina, N.E., Glucagon y Tirosina, a la circulación sanguínea estimularía la célula adiposa, también en sentido lipolítico y productor de calor.

De todas estas sustancias la que mayor acción reguladora tiene y por ello, la que mejor ha sido estudiada, son las catecolaminas y fundamentalmente la N.E., cuya acción lipolítica se desarrollaría según el patrón antes expuesto, a través de los receptores. Dichos receptores han sido particularmente estudiados a nivel del tejido adiposo, tanto blanco como pardo, razón por la cual en varias ocasiones las interpretaciones de los mismos son contradictorias y todavía no unánimes.

Como ya hemos señalado, los receptores de membrana para catecolaminas, pueden tener una función diferente según el tejido utilizado. En el caso del tejido adiposo, en sus variantes blanco y pardo, se viene admitiendo desde que Fain lo describió en 1967, que las catecolaminas a través de su interacción con β -receptores de la membrana del adipocito, estimularían la lipólisis, esta idea ha sido confirmada y ampliada por Nicholls (82); Burns y Langley (83), han demostrado la presencia en el tejido adiposo pardo de α -receptores para distintas sustancias de efecto lipogénico, así como sustancias α -adrenoreceptores bloqueantes que estimularían la lipólisis en el tejido adiposo pardo y en el tejido adiposo humano, pero que no se han encontrado en el tejido adiposo blanco de la rata, como demuestra Itaya (84) a través de la fenotilamina o como la fenoxibenzamina demostrado por Luzio y Jones o como las hormonas TSH, ACTH y glucagon (citados en el trabajo de Itaya).

Por otra parte y simultáneamente otros autores como Moskowitz y Chrisna (85) han evidenciado la acción inhibidora de la hipogénesis como la Prostaglandina E_1 Insulina (85,86) y propranolol (86), que son β -adrenérgicos antagonistas.

Todas estas sustancias lipolíticas citadas, como la N.E., actuarían aumentando el nivel AMPc, mientras que las inhibidas de la lipólisis producirían un decremento de este mismo.

La N.E. liberada por las terminaciones nerviosas o directamente del sistema vascular, actuaría de la forma admitida universalmente para la mayor parte de las hormonas, produce una estimulación de la membrana plasmática del adipocito, bien a través de receptores químicos para la N.E. o bien por despolarización iónica, cualquiera de estos mecanismos llevaría a una activación de la Adenilciclase proteína que amplía y transmite el estímulo o señal al citoplasma produciendo una acumulación de AMPc, el cual a su vez movilizaría las lipasas desencadenando una acción lipolítica (87).

Con ello vemos que el papel y el mecanismo regulador de las catecolaminas sobre el tejido adiposo pardo fuera de duda y cada vez se van conociendo más hormonas y sustancias capaces de potenciar o — inhibir este efecto de las catecolaminas, aunque todavía este conocimiento es muy incipiente y problemática.

I N T R O D U C C I O N

Recientemente se ha demostrado que el tejido graso, -tanto el blanco como el pardo-, poseen receptores para glucocorticoides (Feldman y Loose 1977; Feldman 1978), podemos considerar, por tanto, a las dos variantes de tejido graso como órganos diana de estas hormonas. Pero tan to los efectos concretos sobre el tejido adiposo blanco y menos aún sobre el tejido adiposo pardo, como los mecanismos de acción glucocorticoides nos son todavía desconocidos.

Acciones de los Glucocorticoides sobre el metabolismo general y adiposo:

El efecto primario de los glucocorticoides sobre el metabolis mo hidrocarbonado es una aceleración del proceso conocido como gluconeogénesis. La hipoglucemia y la depleción de glucógeno hepático típicas -

que siguen a una adrenalectomía se corrigen administrando un glucocorticoide potente como el cortisol. Por otro lado, tras esta administración la concentración de nitrógeno urinario se incrementa, probando que la fuente de glucosa no serían los H. de C. sino las proteínas.

Igualmente se considera que estas hormonas tienen un efecto definido sobre el metabolismo de los lípidos. La administración crónica de Hormonas glucocorticoides conduce a los animales a una hiperlipemia e hipercolesterinemia y, en las personas, a una lipogénesis con incremento en la cantidad total de grasas junto a una redistribución centripeta - "androide", de la grasa orgánica.

Otros efectos de los glucocorticoides se hallan estrechamente imbricados (con relación causa/efecto), con estas acciones metabólicas, así:

- La sobredosificación crónica de cortisol origina disminución de la proteína muscular y edema y fibrosis del tejido muscular, y variaciones cuantitativa y de distribución del tejido adiposo.
- Su efecto catabólico o movilizador de proteínas se manifiesta - también a nivel del metabolismo óseo, produciendo una disminución del desarrollo del cartilago, interrupción del crecimiento e inhibición de la neoformación ósea.
- Su efecto sobre las células sanguíneas periféricas: Linfopenia que alcanza el 45 ó 50 % y depleción eosinófila hasta el 90 %, a veces de aparición muy rápida en algunos animales. Efectos que aunque no puedan explicarse bien, pueden suponer, al menos parcialmente, un mecanismo para dejar a disposición del organismo una buena cantidad de proteína que pueda utilizarse de inmediato por caminos gluconeogénicos.

Otras acciones glucocorticoides sin embargo no están ligadas a su efecto metabólico, como:

- Acción sobre el metabolismo hidrosalino, con retención de sodio y agua.
- Acción antiinflamatoria:
 - . disminución hiperemia
 - . disminución exudación
 - . disminución extravasación
 - a dosis altas . disminución de respuesta celular
 - . disminución de liberación y producción de anticuerpos tras un aumento inicial por destrucción de plasmáticas
 - a dosis bajas: No afectan producción Ac.
- E incluso su acción "diabética" ("Diabetes por esteroides"), que se presenta ante una sobredosificación debida al antagonismo insulínico que muestran los glucocorticoides, o que por lo menos, es habitualmente interpretada por este mecanismo, si bien con marcaje isotópico radiactivo puede comprobarse que mayor importancia que este camino tiene la neoglucogénesis.

Pero así como la acción sobre H. de C, y proteínas parece suficientemente explicada, el efecto sobre el metabolismo graso y el tejido adiposo no ha sido demasiado estudiado, y además, entre los autores que se han dedicado a este tema no hay muchas veces acuerdo ni en los resultados ni en la interpretación de los mismos.

La acción lipogénica de los glucocorticoides ha sido observada en grasa blanca y también señalada en tejido adiposo blanco por muchos autores (91,96), a través de:

- Aumento del peso del órgano graso y de su contenido tanto hídrico como lipídico;
- Aumento del tamaño del adipocito;

- Aumento del tamaño de las gotas citoplásmicas; y finalmente,

- Aumento del depósito de triglicéridos por gota,

también confirmada en hígado por Kimberg (1968). Algunos de estos autores (94,95) sin embargo, encuentran esta acción paradójica, ya que en condiciones normales los glucocorticoides tienen una acción antilipogénica. Para explicarse este hecho vienen arguyendo que los lípidos depositados en el tejido graso tienen que provenir del exterior y no a través de una auténtica lipogénesis celular. También se ha intentado explicar (97), la formación de triglicéridos a través del glucógeno.

Los partidarios de la acción lipogénica en los hallazgos enzimáticos y fisiológicos experimentales de la célula grasa, han descrito, en primer lugar una disminución de ácidos grasos oxidables y naturalmente de la oxidación de los mismos, hecho que corrobora la disminución de apoenzimas deshidrogenasas mitocondriales comprometidas en el ciclo de Krebs, así como del coenzima NADH y de los citocromos b y C, igualmente lo confirma la disminución del consumo de O_2 descrita por Kimberg (97) en ratas tratadas con cortisol a los 10 días, que no se normaliza hasta los 30 días, e incluso la disminución de formación de CO_2 descrita por (Skala y cols. 91, Heatom y cols. 98 y Dryer y cols. 99), con marcado isotópico del ácido Palmítico.

Los aumentos descritos en enzimas citoplásmicas del tipo de la glicerofosfato deshidrogenasa NAD, dependiente y Piruvato kinasa activadora del paso Piruvico-acetil coA, nos demostrarían además un posible aprovechamiento energético de la glucosa, un aprovechamiento de la misma para producción de ácidos grasos.

La presencia de alfa-glicerol-kinasa descrita en la célula grasa por Mersmann (100) e incrementada tras la administración de glucocorticoides, nos confirma una activa síntesis de Glicerol, o segundo elemento necesario para la síntesis de triglicéridos.

Los estudios sobre el enzima de membrana Protein-Lipasa y sobre Lipasa Tisular hechos por Hahn (101) y Rault (102), han demostrado que la primera, aumenta durante el periodo de lactancia de la rata, de cayendo al instaurarse la dieta sólida (pobre en grasas) hacia el día - 20. Su aumento tras la administración de Cortisona, indica la acción fa vorecedora de esta en la incorporación de ácidos grasos al adipocito, - acción que siempre estaría mediatizada por la degranulación mastocitaria.

La acción de la Cortisona sobre la lipasa tisular, es total - mente inversa a la de la protein-lipasa, (101), disminuyendo su nivel y por tanto, su acción lipolítica.

Pero junto a estos efectos de los glucocorticoides, han sido descritos en la literatura otros totalmente inversos, que podrían solo explicarnos un efecto lipolítico de estas hormonas, o por lo menos anti lipogénicos, como: Incrementos de las deshidrogenasas mitocondriales com prometidas en el ciclo de Krebs, Depleción de Citocromos C y b, disminu ción de nivel y actividad de coenzimas NAD, atrofia de la grasa blanca y del tejido adiposo blanco, con regresión del órgano graso; así como dis minución en los depósitos de glucógeno del adipocito.

Quizá por parte de estos datos, se explica por las diferentes dosificaciones empleadas; y quizás también, por causa de sobredosifica ciones que conllevarían toxicidad y destrucción celular, fundamentalmen te de algunos organelos entre ellos las mitocondrias.

MECANISMOS DE ACCION DE LOS GLUCOCORTICOIDES

Así como el mecanismo de acción de las catecolaminas, princi pales reguladores (como comentamos anteriormente), sin embargo el mecanis mo de acción de otros reguladores adiposos como los glucocorticoides dis ta mucho de ser totalmente interpretado y sobre todo de serlo con unanimi dad.

A lo largo de la historia se han dado varias interpretaciones que podemos esquematizar en cuatro posturas principales:

- Acción permisiva.
- A través de la N.E.
- A través de la Insulina
- Acción directa con o sin intervención del AMPc.

El efecto permisivo de los glucocorticoides, se elevó a categoría de mecanismo general de estas hormonas, según el cual muchas células sensibles a diversos estímulos sólo reponderían a los mismos si están expuestas a una cierta concentración básica de esteroides adrenales corticales. Esta acción permisiva aparece ejemplificada en múltiples ocasiones, así fué demostrada en el "Síndrome General de Adaptación" por Engel en 1957 (103), o por la carencia de respuesta de las arteriolas al efecto presor de la N.E. en animales adrenalectomizados, o en la absorción de glucosa y calcio en el intestino de animales en iguales circunstancias, entre otros varios ejemplos.

En cuanto a la acción de los glucocorticoides a través de la N.E., ha sido demostrado (91,96), la Cortisona disminuye en un tercio la acción de la N.E., de ahí que aumenta la lipogénesis, el número y tamaño de vesículas, incluso el tamaño de la grasa y el peso del animal - absoluta y relativamente según estos autores. Esta acción conllevaría también una inhibición mitocondrial y naturalmente disminución de la lipólisis y de la producción de calor.

Otros autores sin embargo piensan que la acción de la Cortisona y glucocorticoides, en el tejido graso, más que a una inhibición de la N.E., se debe a una liberación de Insulina o por lo menos a un mecanismo permisivo de los glucocorticoides.

El mecanismo de acción de los glucocorticoides, ha sido ampliamente tratado en un trabajo de revisión por Thompson y Lippman en 1974, y partiendo de la sinapsis que el mismo aporta de todos los datos bibliográficos y añadiendo los de posterior aparición, podría esquematizarse así:

El glucocorticoide segregado por el cortex adrenal pasa a sangre donde puede ser transportado de formas:

- Unido a alfa globulinas, transcortina o globulina transportadora de Corticoides (CBG)
- Unido a albúminas.
- Como hormona libre, siendo esta última fracción la mas pequeña en condiciones fisiológicas, siempre inferior al 10 %, y además la única forma capaz de interactuar con los tejidos diana — (105,106).

Como hace un momento comentábamos, Feldman y Loose (88), han venido a confirmarnos que el tejido adiposo posee receptores citoplásmicos para los glucocorticoides y esteroides en general, y que, por tanto, es un órgano diana de estas hormonas. Dichos receptores son proteínas termolábiles cuya afinidad por los diferentes esteroides sigue la siguiente secuencia:

Dexametaxona > Corticosterona > Progesterona

Aldosterona > Cortexolona > Testosterona > Estradiol,

por tanto con alta afinidad y especificidad para los glucocorticoides. Podemos asumir por tanto que la fracción libre de los glucocorticoides plasmáticos se une a estos receptores.

Sin embargo los receptores aislados por Feldman se hallan en la fracción citosol y no en membrana, indicándonos que en este caso no

se seguirá el camino señalado antes para la N.E., insulina y mayor parte de las hormonas, sino que directamente el glucocorticoide atravesará la membrana plasmática del adipocito y se unirá al receptor citoplásmico.

Un problema no resuelto es si la acción se realiza directamente por el complejo receptor/glucocorticoide o si necesita como en el caso de la N.E. y otras hormonas, la intervención del AMPc como "segundo mensajero".

Las experiencias pretendiendo aclarar este extremo son muchas y con resultados diferentes. Algunos autores (107,108) han confirmado que el AMPc es necesario para que los glucocorticoides realicen su acción atribuyéndole el papel de mensajero. Sin embargo otros trabajos, mas numerosos, señalan que es necesaria la interacción del glucocorticoides - con el AMPc, pero no como un eslabón más de la cadena de acción sino simplemente porque el AMPc realizaría funciones específicas de fosforilización etc., sin las cuales el complejo esteroide/receptor no podría ser efectivo, pero sin que nunca halla una acción directa del AMPc; y finalmente otros autores (109,110) interpretan que es directamente el complejo glucocorticoide/receptor el que entraría en el núcleo y actuaría sin intervención ninguna del AMPc.

Otra particularidad de la manera de actuar los glucocorticoides es que parece confirmado que su acción no se realiza directamente en el citoplasma, sino que requiere alcanzar e informar al DNA nuclear para interferir la síntesis de RNA_m que dirigiría la síntesis de la proteína enzimática efectiva o capaz de desencadenar el efecto deseado por el glucocorticoide. Este hecho ha sido evidenciado por muchos caminos: A través de inhibidores del DNA como la Actinomicina D, (111,112,113), Radiaciones ultravioletas, Rayos X y otras sustancias inhibidoras de la — RNAasa polimerasa (114), mediciones directas (115), e incluso por la dilación de tiempo que media entre la administración del glucocorticoide y la respuesta celular.

Se piensa, por tanto, que bien por interacción del AMPc o sin ella, el complejo glucocorticoide/receptor alcanza el núcleo. Este paso puede realizarse en unión al receptor citoplásmico o tras un recambio - de este por otro receptor nuclear como afirman Sekeris y cols. (116,117) y Muck (118), y una vez allí modificarían el sistema: DNA, RNA_m, síntesis protéica.

Esta última acción ha sido también explicada de diferentes maneras en distintas experiencias: -Para algunos, la síntesis protéica podría ser estimulada o inhibida por alteraciones en la "cantidad" de RNA sintetizado (119); -Para otros, los glucocorticoides producirían una inhibición de la RNA polimerasa (114); o bien, como sugieren Sajdel y Jacob (120), la RNA polimerasa sufriría una alteración "alostérica" por el glucocorticoide, mejorando así su actividad. -Hay también quienes preconizan una alteración del DNA, por lo tanto de los genes estructurales, para la transcripción (121); o un bloqueo de la transcripción de ciertos tipos de RNA_t; pero lo más probable parece ser que el glucocorticoide provoque la síntesis de nuevos tipos de RNA_m capaces de dar las proteínas enzimáticas requeridas para la respuesta, de lo cual hay evidencias en la células grasa (111), timocitos (106,122) músculo (123), a través de bloqueantes como la Actinomicina D.

Podemos resumir diciendo como expresa textualmente el mismo — (Thompson: "No está claro el mecanismo exacto de la actuación de los esteroides en la célula, lo que sí se puede apreciar es que, tanto los esteroides como los receptores citoplásmicos, como, los nucleares (si existen), el DNA y RNA, están involucrados en la respuesta". Y esta falta de claridad sobre el mecanismo general de glucocorticoides no sólo es ampliable al Tejido Adiposo Blanco, sino también, y con mayor desconocimiento, al tejido pardo principal objeto de nuestro estudio.

Estas son las razones principales de que hayamos elegido este - tema como objetivo de nuestro estudio y proponiendonos fundamentalmente clarificar, en lo posible, la acción concreta de los glucocorticoides - en el adipocito pardo seleccionando cuidadosamente las dosis usadas, to da vez que la gran variedad de las empleadas por distintos autores nos ha parecido la principal fuente de controversia en los resultados.

El primer problema que se nos ha planteado ha sido el de elegir el momento, la dosis y la pauta de administración de los glucocorticoides.

1º. Momento:

Seleccionamos para la inyección ratas posnatales, cu ya edad comprendía desde el día 3 al 20, por varias - razones. En primer lugar es el periodo de mayor actividad del tejido adi poso pardo en la rata, toda vez que es el tiempo en que el animal ha de pasar de la temperatura materna a la ambiental y finalmente a la basal - adulta (44,45,46) mientras que a partir del día 20, sólo tendría función de mantenimiento en la rata normal y en condiciones fisiológicas. Por - otro lado, este periodo, corresponde al de lactancia (a partir del día - 20, el animal ingiere alimento sólido (Hahn, 1966), por lo que la inges ta rica en grasa facilita una mayor actividad del adipocito pardo. Ade más este tiempo coincide con el periodo madurativo del órgano pardo en la rata (38), lo cual nos permite medir la influencia del glucocorticoi de en el mismo y con el establecimiento del ritmo circadiano definitivo - que ocurre a las cuatro semanas, siendo hasta entonces los ciclos de - dos días de duración (124,125). Y por último, y sobre todo, este tiempo - viene a ser equivalente al periodo de mayor actividad del tejido adiposo pardo en la especie humana, calculado en las primeras semanas de vida, - tiempo a partir del cual se atrofiaría e involucionaría, permitiendonos - así una aplicación de nuestra experiencia a la clínica humana.

Igualmente, se excluyeron los cuatro primeros días de vida de la rata porque el nivel de glucocorticoides de la rata al nacer debe su con

centración a la secreción materna.

2º. Dosis y pauta de administración:

Como antes hemos comentado, -
nos parece precisamente la do
sificación y pauta de administración tan diferente y elevada, lo que ha
creado mayor conflictividad en los resultados hallados por diferentes -
autores.

El glucocorticoides más abundantemente segregado por el cortex
adrenal de la rata es la Corticosterona, de acción equivalente al Corti
sol, principal secreción del resto de mamíferos no roedores, entre ellos
el hombre. Nosotros, partiendo del cálculo de la secreción de la suprarenal
de la rata, del día 1 al 20 de vida, hemos buscado una dosis y una -
pauta de administración que fuesen el equivalente a un tratamiento inten
so y prolongado en clínica humana, con el fin de conseguir un efecto far
macológico mantenido, pero huyendo de los efectos tóxicos de las elevadí
simas dosis empleadas hasta ahora por numerosos autores.

De acuerdo con todos estos requisitos, la dosis de elección pa
ra nosotros ha sido 5 mg. de Hidrocortisona por Kg de peso y día (equi
valente a 1,25 mg. de Prednisona por Kg. y día), inyectándose diariamen
te desde el día 5 al 21 de la vida de la rata.

En la mayor parte de los trabajos existentes se administran do
sis sumamente elevadas, en un periodo de tiempo muy corto, bien de 1 a -
3 días, o bien en inyección única, hecho que también aleja estas experien
cias de su posible aplicación a la clínica humana. Así Aronson (1954) en
hamster y ratones prepuberales viene inyectando 1 mg. de cortisona por -
cada 4 g. de peso y día (250 mg. por Kg. y día) durante dos días; y Hahn
y cols. (1969) administran 1 mg. de cortisona por cada 20 g. de peso y
día (50 mg. por Kg. y día) durante 1 a 3 días, a ratas de 7 a 10 días de
vida, es decir una dosis diez veces superior a la empleada por nosotros.

Parece indudable que dosis tan elevadas han de producir efectos tóxicos que invalidarían los resultados obtenidos, Esta impresión viene a confirmarla el estudio de Kimberg (1968). Este autor administró 5 mg. de Cortisona por día, durante 6 días a ratas de 125 gr. de peso (1 mg. de Cortisona por 25 gr. de peso y día), y estudió sus efectos sobre las mitocondrias del hígado con los siguientes resultados:

- a) Las mitocondrias aumentan de tamaño y disminuyen en número.
- b) Con microscopia electrónica, se observa una degeneración de - las mismas con aumento del tamaño de la matriz, aplanamiento - de las crestas envolventes, involución y pérdida de las crestas y disminución del número de gránulos densos de la matriz; todos ellos atributos morfológicos típicos de degeneración mitocondrial e inhibición funcional.
- c) Corroboran estos datos morfológicos la inhibición de la actividad de la citocromo B y C, así como del coenzima NAD.

De todos estos hechos, el autor deduce que hay una inhibición mitocondrial acompañada de desacoplamiento en los mecanismos de respiración/fosforilización oxidativa, debidos a una degeneración mitocondrial.

Skala y Hanh (1970) constatan igualmente una incrementada fragilidad de las mitocondrias de la grasa parda en las ratas de 10 días-inyectadas 24 h. antes, con una dosis única de 1 mg. de Cortisona por - cada 20 gr. de peso.

Nosotros hemos elegido una dosis significativamente mas baja por este doble motivo:

- 1ª.- Para evitar que cualquier efecto tóxico enmascare el verdadero efecto farmacológico de los glucocorticoides sobre la grasa parda que pretendemos investigar; y

2º.- Al emplear una dosis y un periodo de administración equivalente a un tratamiento glucocorticoide de moderada intensidad en clínica humana (1,25 mg. de Prednisona por Kg. y — día), queremos dejar abierta la posibilidad de una futura aplicación de nuestros resultados al campo de la pediatría.

Los parámetros elegidos para valorar los posibles efectos de los glucocorticoides sobre la grasa parda son los siguientes:

- 1º. Peso corporal.
- 2º. Peso del Tejido Adiposo Blanco
- 3º. Diámetro de los adipocitos pardos.
- 4º. Número de gotas por adipocito.
- 5º. Histoquímica óptica:
 - Enzimática.
 - No enzimática.
- 6º. Histoquímica electrónica:
 - Enzimática.
 - No enzimática.
- 7º. Datos estructurales y ultraestructurales.

La valoración de algunos de los resultados, como se verá en el capítulo de material y métodos, se llevó a cabo comparando mediante un riguroso método estadístico, un grupo de animales inyectados y otro de animales testigos.

91

MATERIAL y METODOS

MÉTODOS
HISTOLÓGICOS, HISTOQUÍMICOS y
ULTRAESTRUCTURALES

Se utilizaron ratas blancas de raza Wistar distribuidas en - nueve camadas de 7 a 10 crías cada una. En cada camada se utilizó el sistema de números aleatorios para decidir cuales iban a ser controles y - cuales se iban a utilizar como reactivas, es decir se les inyectaba act cortina. De ellas se iba a tomar siempre un número par y si el número de crías de la camada era impar, al que le correspondiese el nº 3 quedaría sin marcaje alguno en la camada, hasta la hora del sacrificio.

Una vez clasificados, obtuvimos 2 poblaciones: La población CONTROL formada por las ratas que en la tabla de números aleatorios le - correspondían números impares y la población INYECTADOS a las que le - correspondían números pares. En esas nueve camadas, obtuvimos un total de 70 individuos, 35 de los cuales formaban la población control y 35 la población inyectada.

Al quinto día de vida postnatal, eran pesados todos los animales y se marcaban para poder distinguir a cada animal, estableciendo ya a los animales controles e inyectados, a estos últimos desde el día 5 hasta el 21 se inyectaba diariamente ACTOCORTINA (Leo) a dosis de 5 mg/Kg. peso, - renovando cada tres días, la dosis según el peso del animal. En el día 21 los animales eran pesado en el momento anterior al sacrificio después del cual se extraía el órgano graso interescapular por disección, pesándose a continuación e inmediatamente se incluía según las técnicas deseadas. Estas técnicas las podemos dividir en tres apartados:

Microscopia óptica: donde las piezas se fijaban en formol al 10 %, y posteriormente se procesaban según los diferentes métodos expuestos a continuación.

Valoración histoquímica: para ello las piezas fueron - congeladas inmediatamente y otras fijadas en formol-calcio y posteriormente congeladas o en acetona o formol, en todos los casos, se obtuvieron - cortes de 7 micras con criostato, las cuales fueron incubados con los substratos correspondientes. Después de incubadas, y contrastadas y montadas - las preparaciones, la valoración de su actividad se realizó por conteo de granos de precipitados por unidad de superficie celular, comparando no sólo la diferencia entre animales con actocortina y controles, sino con tejido adiposo blanco y músculo y actividad en capilares y vasos. Por otra parte, siempre y en cada una de las técnicas, se realizaron las incubaciones con los substratos correspondientes junto a incubaciones sin substratos (a las que hemos denominado testigos), para poder demostrar la veracidad de la técnica, así como la localización específica de dicha enzima.

Así mismo se realizaron técnicas de histoquímica aplicadas a microscopia electrónica, para lo cual las piezas en fresco fueron incubadas y posteriormente fijadas en glutaraldehído para su inclusión en microscopia electrónica, o eran fijadas ligeramente y posteriormente incubadas, incluyendo

las después según las técnicas de la microscopia electrónica. (136)

Por último, otro de los apartados fué la inclusión directa para microscopía electrónica, utilizando Vestopal o Araldita y de ahí se obtuvieron cortes semifinos para la valoración estadística y cortes ultrafinos para la observación ultraestructural del tejido.

Se realizaron para cada caso las siguientes:

MICROSCOPIA _ _ OPTICA

- Hematoxilina-eosina.
- Sudán rojo.
- Sudán negro.
- Oil red.
- Acido ósmico para lípidos insaturados.
- Fischler para ácidos grasos.
- Reacción de Schiff con el perfámico y el peracético.
- PAS.
- Van Gieson.
- Reticulina de Gomori.
- Azul de toluidina.
- Técnicas descritas en el Mac Manus (131).

HISTOQUIMICA

- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Hess, Scarpelli y Pearse 1958, ref. 133).
- Succino deshidrogenasa (modificacion de Nachlas y col. — 1957, ref. 132).
- Malico y Lactico deshidrogenasas (modificacion del método de Nachlas y cols. 1958 y Hess y cols. 1958, ref. 132).
- NADH diaforasa (modificada de Scarpelli y cols. 1958 ref. 132).
- Lipasa (Pearse modificada de Gomori 1952, ref. 133 y modificaciones propias).
- L-naftil esterasa (Nachlas y Seligman 1948. Seligman y cols. 1959, ref. 132).
- Naftol AS esterasa (Burstone 1957, ref. 132).
- Adenosin trifosfatasa (Wachstein y cols. 1960, ref. 134)
- Fosfatasa alcalina (modificacion de Gomori 1952, ref. 134)
- Fosfatasa ácida (Gomori 1949, ref. 132).
- Citocromo oxidasa (Pearse modificacion de Nachlas 1958, ref. 133).
- Lipoprotein lipasa (Korn (154) y modificaciones propias).

HISTOQUIMIA A MICROSCOPIA ELECTRONICA

- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (medio incubacion deri
vado de Ogawa y cols. 1968, ref. 135).
- Citocromo oxidasa (modificacion del método de Bernard y
cols. 1971, ref. 25).
- NADH diaforasa (técnica sobre ferricianuro de Ogawa y
cols. 1968, ref. 135).
- Lipasa- (Nagata y Murata 1972, ref. 170).

75

METODOS ESTADISTICOS
=====

En este apartado de nuestro trabajo, nos planteamos estudiar - en una primera parte, el peso corporal y el peso del órgano interescapular de los animales objeto de nuestro estudio, con valoración estadística para establecer si existen o no diferencias significativas.

El diseño del experimento se realizó sobre ratas de 21 días - de edad, a parte de las cuales se le inyectó diariamente desde el quinto día de vida 5 mg/Kg de peso de Acto Cortina (leo), siendo sacrificadas - al 21 día.

El muestreo de las ratas, se realizó como se indica posteriormente, según la tabla de números aleatorios estableciendo dos poblaciones: Animales controles y Animales inyectados.

Para efectuar la valoración estadística, hemos planteado los siguientes pasos:

1ª) Definición de las poblaciones que vamos a comparar

- a) Población control. - Constituida por camadas de ratas que serán sacrificadas a los 21 días.
- b) Población del factor cortisona o población inyectada. - Compuesta por camadas de ratas que serán inyectadas al quinto día de nacimiento a razón de 5 mg/Kg. de peso y sacrificadas a los 21 días de edad.

2ª) Criterios y formulación de objetivos

Escogemos caracteres cuantitativos para estudiar las poblaciones, siendo los elegidos el peso del tejido interescapular del tejido adiposo pardo, en poblaciones controles e inyectadas en el momento del sacrificio, y el peso de los animales en el instante anterior

al sacrificio.

Nuestras experiencias previas demuestran que ambos fenómenos, peso del tejido adiposo pardo y peso corporal, son aleatorios, por tanto los objetivos son, en consecuencia:

- a) Someter a prueba estadística el efecto de la cortisona sobre el peso del tejido adiposo pardo.
- b) Someter a prueba el efecto de la cortisona sobre el peso corporal de los animales inyectados.

3º) Test estadístico

Efectuaremos, inicialmente, dos tests de comprobación de medias: (126, 127).

- a) Comprobación de medias de pesos del tejido adiposo pardo entre controles e inyectados.
- b) Comparación de medias de pesos corporales entre controles e inyectados.

Puesto que es posible que haya una fuerte correlación entre los pesos corporales y los pesos del tejido adiposo pardo, tanto en controles como en inyectados, haremos un test bivalente de comparación de vectores de medias que al tener en cuenta el valor del coeficiente de correlación, potencia el valor de la comparación. (128, 129, 130)

4º) Diseños de los experimentos

- a) Diseño de la comparación de medias de pesos del tejido adiposo pardo en controles e inyectados. Test unilateral:

$$H_0: \mu_i = \mu_c \quad ; \quad H_1: \mu_i > \mu_c$$

Tratándose de un experimento inédito, no hay información sobre el valor de la varianza, por lo que es necesario efectuar un muestreo - aleatorio previo para estimar su valor. Hemos muestreado 49 animales, - 24 controles y 25 inyectados, obteniendo los siguientes resultados:

<u>Controles</u>		<u>Inyectados</u>	
n_1	= 24	n_2	= 25
$\sum x$	= 5073 mg	$\sum y$	= 6158 mg
$\sum x^2$	= 1094019 mg ²	$\sum y^2$	= 1611822 mg ²
$23 S_1^2$	= 21713,7 mg ²	$24 S_2^2$	= 94983,5 mg ²

Suma de varianzas estimadas = 4901 mg

En el siguiente diseño, las notaciones significan:

- α Probabilidad de concluir, mediante el muestreo, que exista una diferencia entre las medias verdaderas de las poblaciones control e inyectada, cuando en realidad las medias no difieren.
- β Probabilidad de concluir, mediante el muestreo, que no existe diferencia entre las medias, cuando en realidad hay diferencia entre ellas. Beta es pues, la falta de potencia del Test, para poner de manifiesto una diferencia que realmente existe entre las medias.
- Δ Diferencia de medias verdaderas en miligramos, que estamos interesados en poner de manifiesto con una potencia $1 - \beta$

n Número de individuos, necesarios en cada grupo, el mismo para controles e inyectados, para poner de manifiesto una diferencia dada Δ con valores dados de α , β .

La tabla siguiente contiene distintos diseños de tests unilaterales, para valores de α , β , Δ ; válidos exclusivamente para resultados en que $n \geq 30$.

α	β	Δ	Potencia del Test	Nº animales necesarios
5 %	5 %	50 mg	95 %	21,22 *
5 %	5 %	40 mg	95 %	33,16
5 %	5 %	30 mg	95 %	58,94
5 %	2,5 %	50 mg	97,5 %	25,47 *
5 %	2,5 %	40 mg	97,5 %	39,81
5 %	2,5 %	30 mg	97,5 %	70,77
2,5 %	2,5 %	50 mg	97,5 %	30,12 *
2,5 %	2,5 %	40 mg	97,5 %	47,07
2,5 %	2,5 %	30 mg	97,5 %	83,68

Los diseños marcados con asteriscos, dan n valores, menores de 30 individuos y deben ser deshechados, pues ignoramos si la distribución del peso del tejido adiposo pardo es normal en la población de controles y en la de inyectados.

Nos decidimos por el siguiente diseño:

α	β	Δ	Potencia del Test	Nº individuos
5 %	5 %	40 mg	95 %	33,16

La hipótesis nula es. $H_0 = \mu_c = \mu_i$ contra la alternativa $H_1 : \mu_i > \mu_c$, o más concretamente $H_1 : \mu_i = \mu_c + 40$ mg. son las medias verdaderas de controles e inyectados, respectivamente.

b) Diseño de la comparación de medias corporales en controles e inyectados; test unilateral:

$$H_0 = \mu_i = \mu_c ; H_1 : \mu_i > \mu_c$$

La estimación de la varianza en la muestra exploratoria de 49 individuos, 24 controles y 25 inyectados, da:

n_1	=	24	n_2	=	25
$\sum x$	=	814,3 g	$\sum y$	=	885,15 g
$\sum x^2$	=	27.958,864	$\sum y^2$	=	31956,961
$23 S_1^2$	=	330,344 g ²	$24 S_2^2$	=	617,314 g ²

Varianza estimada $s^2 = 20,3 \text{ g}^2$

Desviación estándar $s = 4,505 \text{ g.}$

La comparación anterior relativa al tejido adiposo pardo, con mucho, más interesante que esta última relacionada con el peso corporal al sacrificio, expresada en gramos. Resulta natural aceptar como número de individuos, el calculado para la comparación del tejido adiposo pardo y determinar en este diseño los valores de las diferencias que es posible detectar con este tamaño de muestra. La tabla siguiente muestra los diseños en relación con los valores obtenidos para el tejido adiposo pardo, excluyendo los valores de n menores que 30.

L	B	n	Potencia	Diferencia detectable Δ
5 %	5 %	33,16	95 %	3,64 g
5 %	5 %	58,94	95 %	2,73
5 %	2,5 %	39,81	97,5 %	3,64
5 %	2,5 %	70,77	97,5 %	2,73
2,5 %	2,5 %	30,12	97,5 %	4,55
2,5 %	2,5 %	47,07	97,5 %	3,64
2,5 %	2,5 %	83,68	97,5 %	2,73

El diseño, acorde con la elección hecha para la primera comparación del tejido adiposo pardo es:

L	B	n	Potencia	Diferencia Δ
5 %	5 %	33,16	95 %	3,64 g

Esto quiere decir, que con una muestra de 34 individuos, es posible detectar diferencias de 3,64 g. o más, entre los pesos corporales de las dos poblaciones con una probabilidad de 95 % de estar decidiendo correctamente. La probabilidad de dejar escapar diferencias de 3,64 g. o más, que existen, es pequeña, 5 %.

5ª) Diseño del muestreo

La igualación del número de individuos en los dos tests, permite diseñar el muestreo de ambos de una sola vez. Además, este muestreo es válido para el test bivalente que se efectuará posteriormente.

Por experiencia sabemos, que las camadas de ratas, tienen de 5 a 10 crías como término medio; para decidir que animales van a ser con-

troles y cuales inyectados, utilizaremos permutaciones aleatorias de 5, 6, 7, 8, 9 y 10 elementos, con el siguiente código:

Número par, serán inyectados.

Números impares, serán controles.

Si la camada tiene un número impar de crías, el animal, al - que le corresponda siempre el número tres, no será marcado, ni como control ni como inyectado, pero permanecerá en la camada hasta la hora del sacrificio.

Calculamos que quince camadas son suficientes para cubrir los 68 animales necesarios, según nuestro diseño: 34 controles y 34 inyectados.

A continuación damos el diseño aleatorio para cada camada:

Permutaciones aleatorias que se utilizarán, según el número de animales de cada camada

Camada nº 1

5; 1; 3; 2; 4	<u>3; 8; 7; 5; 2; 4; 1; 6</u>
3; 4; 2; 5; 6; 1	8; 5; 2; 1; 4; 3; 9; 6; 7
3; 5; 6; 1; 4; 7; 2	6; 10; 4; 2; 9; 7; 3; 5; 8; 1

Camada nº 2

3; 2; 4; 1; 5	<u>3; 8; 7; 2; 1; 4; 6; 5</u>
1; 5; 3; 4; 6; 2	6; 4; 9; 5; 3; 2; 1; 7; 8
3; 6; 2; 7; 1; 4; 5	8; 9; 7; 10; 3; 2; 5; 4; 6; 1

Camada_nº 3

2; 5; 3; 1; 4

4; 1; 5; 2; 3; 6

5; 7; 1; 6; 2; 3; 4

3; 2; 1; 8; 4; 7; 5; 6

1; 3; 9; 8; 7; 4; 2; 5

7; 8; 5; 9; 10; 3; 2; 1; 4; 6

Camada_nº 4

2; 5; 4; 3; 1

3; 4; 5; 6; 1; 2

7; 1; 4; 2; 6; 5; 3

3; 2; 8; 4; 5; 1; 6; 7

3; 6; 5; 2; 1; 7; 8; 9; 4

5; 6; 10; 7; 2; 8; 9; 4; 1; 3

Camada_nº 5

5; 3; 1; 2; 4

4; 6; 2; 5; 1; 3

7; 3; 1; 6; 5; 2; 4

2; 7; 1; 3; 8; 4; 6; 5

3; 1; 6; 8; 2; 4; 9; 5; 7

3; 8; 2; 1; 9; 7; 10; 6; 4; 5

Camada_nº 6

5; 1; 3; 2; 4

5; 4; 2; 3; 1; 6

2; 7; 1; 5; 3; 4; 6

4; 6; 8; 2; 1; 5; 3; 7

6; 4; 3; 9; 1; 5; 7; 8; 2

10; 2; 7; 3; 8; 9; 4; 6; 1; 5Camada_nº 7

5; 3; 1; 2; 4

4; 2; 5; 6; 1; 3

5; 6; 4; 1; 7; 3; 2

2; 3; 1; 5; 4; 7; 6; 8

6; 9; 5; 1; 7; 4; 2; 3; 8

6; 7; 8; 4; 1; 3; 10; 2; 5; 9

Camada_nº 8

1; 5; 2; 3; 4;

4; 5; 2; 6; 3; 1

7; 2; 4; 5; 6; 1; 3

8; 3; 7; 2; 1; 5; 4; 6

3; 8; 7; 2; 5; 4; 6; 1; 9

9; 10; 7; 5; 3; 8; 4; 1; 6; 2

Camada_nº 9

3; 2; 5; 4; 1	2; 8; 7; 6; 3; 1; 5; 4
<u>1; 4; 2; 3; 6; 5</u>	4; 6; 3; 7; 5; 8; 9; 2; 1
6; 3; 2; 5; 4; 7; 1	2; 3; 10; 6; 9; 4; 8; 5; 7; 1

Camada_nº 10

3; 5; 4; 1; 2	1; 5; 2; 3; 8; 7; 4; 6
5; 6; 1; 2; 4; 3	5; 1; 9; 4; 7; 2; 8; 6; 3
7; 3; 5; 4; 2; 6; 1	3; 6; 4; 10; 5; 7; 2; 9; 1; 8

Camada_nº 11

1; 3; 4; 2; 5;	2; 4; 5; 8; 6; 7; 3; 1
3; 4; 1; 5; 2; 6	3; 1; 9; 4; 5; 8; 7; 6; 2
4; 7; 3; 1; 6; 2; 5	3; 7; 5; 4; 6; 9; 1; 2; 10; 8

Camada_nº 12

2; 5; 4; 3; 1	2; 3; 4; 7; 6; 5; 8; 1
2; 5; 1; 6; 3; 4	9; 3; 6; 1; 4; 8; 5; 7; 2
6; 7; 1; 4; 5; 2; 3	3; 2; 10; 1; 6; 7; 5; 8; 9; 4

Camada_nº 13

4; 1; 5; 2; 3	2; 8; 3; 7; 4; 5; 6; 1
2; 4; 3; 6; 5; 1	5; 4; 8; 7; 9; 6; 1; 3; 2
7; 5; 1; 4; 2; 3; 6	7; 2; 4; 1; 8; 6; 3; 5; 10; 9

Camada_nº 14

1; 2; 3; 5; 4;	3; 7; 8; 5; 6; 1; 4; 2
2; 4; 1; 6; 5; 3	2; 1; 7; 5; 8; 9; 4; 6; 3
7; 1; 6; 5; 2; 3; 4	6; 4; 3; 5; 9; 8; 1; 7; 10; 2

Camada nº 15

3; 4; 2; 5; 1	5; 7; 4; 8; 6; 3; 2; 1
6; 4; 1; 5; 2; 3	5; 3; 1; 4; 6; 2; 7; 9; 8
6; 1; 2; 3; 7; 4; 5	2; 7; 5; 10; 1; 6; 3; 4; 9; 6

Nota: Las hileras subrayadas correspondientes a las 9 primeras camadas, corresponden a las obtenidas durante el periodo septiembre/diciembre. Fueron numeradas en el mismo orden en que indica la permutación subrayada, obteniendo ya en las 9 primeras camadas un número superior de individuos.

109

109

R E S U L T A D O S

112

113

RESULTADOS

ESTRUCTURALES Y ULTRAESTRUCTURALES

RESULTADOS ESTRUCTURALES Y ULTRAESTRUCTURALES

En los cortes estudiados con tratamiento esteroideo como sin él, se puede observar la distribución en lobulillos del tejido adiposo pardo (fig. 1).

Con las técnicas de microscopía de luz, hemos puesto de manifiesto la estructura de este tejido, compuesto por células poligonales de tamaño inferior al del tejido adiposo blanco, de núcleo central y nucleolo patente junto al aspecto multilocular que es el patrón característico de los adipocitos pardos (fig. 2). Con técnicas de contraste lipídico se observa el alto contenido graso de las vacuolas de los adipocitos (fig. 12 a 17) y con impregnaciones de plata se revelan gran cantidad de fibras de reticulina rodeando a modo de red a los adipocitos pardos (fig. 18) así como la presencia de mucopolisacáridos, dada por la positividad de PAS (fig. 19). Si utilizamos contrastes metacromáticos podemos descubrir la presencia de otro tipo celular dentro del tejido, que son los mastocitos o células cebadas (fig. 20) repletas de granos metacromáticos.

De las posibles diferencias entre las poblaciones de ratas — controles y bajo la influencia de la cortisona, solo es posible poner de manifiesto la mayor coalescencia de las vacuolas lipídicas, así como el menor número de gotas por adipocito, siendo estas por el contrario más grandes, siendo el diámetro de las células igual en ambas poblaciones (ver estudio estadístico) (fig. 21a, b y 22a, b). Otra de las diferencias observadas es la presencia de un mayor número de mastocitos en la población inyectada respecto a la población control, así como una mayor degranulación de dichos mastocitos de las ratas inyectadas con hidrocortisona (fig. 23) (ver comentarios histoquímicos).



Dado que la microscopía de luz, no aporta todas las posibles diferencias, por la acción de los glucocorticoides, fué necesario hacer una valoración más fina a nivel ultraestructural.

En los cortes ultrafinos observados con microscopía electrónica se ven los lobulillos del tejido adiposo pardo delimitados por septos conjuntivos (fig. 4) con fibrocitos, fibroblastos y fibras de colágeno, junto a una rica vascularización de este tejido, cuyos vasos penetran por los tabiques conjuntivos, los cuales se van afinando a medida que profundizamos cada vez más hasta quedar envolviendo finamenta a cada adipocito (fig.25); llamando la atención, la presencia de fibras colágenas más numerosas que las de reticulina, hecho que contrasta con las observaciones de microscopía de luz, en la que parece perderse la colágena y aumentan por el contrario las fibras de reticulina en las proximidades celulares. Los fibrocitos y fibroblastos presentes (fig.26) se mantenían en los espacios intercelulares mayores, es decir en la confluencia de 3 ó más células.

La red capilar por el contrario es abundantísima y frecuentemente podemos observar una célula rodeada de 3, 4 ó más secciones capilares (fig.27 a,b), estructura que se corresponde con un patrón típicamente endocrino. Las células endoteliales, no presentan componentas distintos a las de otras localizaciones y se rodean por una membrana basal continua que ocasionalmente puede estar engrosada (fig 7) y que siempre se separa de la membrana basal del adipocito por un espacio anhisto o con escasas fibras colágenas. Eventualmente se observa algún pericito (fig. 28 y 29).

Hay que destacar sobre todo en el tejido adiposo pardo de las ratas tratadas con hidrocortisona, la presencia de células de tipo histiocitario de contorno irregular con invaginaciones de membrana que pueden penetrar en el citoplasma y que en las secciones transversales

se muestran como un sistema vacuolar o tubular, con abundantes citolissomas de morfología variada, así como la presencia de cuerpos multivesiculares (fig.31 a 34).

Por último, la presencia de mastocitos cargados de gránulos - electrodensos de morfología variada (fig.35 y 36) como cuerpos en escarpela o dibujando figuras mielínicas características, aunque los más abundantes presentan disposición uniformemente electrodensa (fig.37), y que en el tejido adiposo normal se hallan bien delimitados por el citoplasma celular (fig.38 y 39); por el contrario bajo la influencia de los glucocorticoides era manifiesta la presencia de mastocitos de morfología más irregular con abundantes cavidades comunicadas con el exterior, formadas por repliegues más o menos profundos de la membrana plasmática, en cuyo seno, así como en la superficie del mastocito se ven gránulos liberados no envueltos por membrana y de notable electrolucidez (fig.40,41), producto de degranulación y en cuya interpretación entraremos mas adelante, en el capítulo de comentarios enzimáticos.

Respecto al parenquima del tejido adiposo pardo, se observan los adipocitos de forma poligonal (fig.42) cuya membrana plasmática presenta finas invaginaciones, generalmente visibles solo a grandes aumentos (fig.43) y eventualmente podían observarse, unas uniones especiales entre ellos (fig.44) así del tipo de uniones de apertura.

El núcleo de los adipocitos pardos es de forma redondeada u oval (fig.45) con cromatina laxamente dispuesta con algunos espesamientos junto a la membrana nuclear y con un nucleolo bien patente de tipo reticular y en el que pueden observarse perfectamente sus componentes, para fibrilar y paramorfa (fig.46).

Una de las características más notables de estas células es la gran profusión mitocondrial, mitocondrias pleomórficas de matriz - electrodensa y crestas paralelas estrechamente empaquetadas, siendo - posible observar en algunas de ellas la presencia de gránulos electrodensos (fig. 47). Estas mitocondrias se hallan en todo el hialoplasma pero con mayor frecuencia rodeando a las gotas lipídicas.

Rellenando prácticamente los espacios hialoplásmicos entre las mitocondrias se observa gran cantidad de acúmulo de glucógeno — (fig. 48 a 50) hecho que contrasta fuertemente con las observaciones bajo tratamiento con hidrocortisona, en las cuales se confirma la desaparición o no presencia de estos llamativos acúmulos de glucógeno — (fig. 51 y 52).

Los adipocitos pardos son también llamados células multiloculares a diferencia de los adipocitos blancos o células uniloculares, esto es debido a la disposición de sus gotas lipídicas que se presentan en gran número, rodeadas de retículo liso y mitocondrias, su tamaño es variable y son fuertemente electroclaras dándole el patrón característico de los adipocitos pardos (fig. 42 y 53). Bajo el tratamiento - esteroideo estas gotas, que en el tejido normal se hallan bien delimitadas y son muy numerosas, presentan una mayor tendencia a la coalescencia y fusión de dichas gotas lipídicas, observando por tanto un incremento de volumen de dichas gotas, así como un menor número (fig. 54a58).

El resto de las organelas celulares son generalmente escasas; así se pueden observar alguna roseta ribosómica (fig. 59) eventualmente cuerpos multivesiculares (fig. 60 y 61) y es muy escasa o nula la presencia de retículo endoplásmico rugoso y Golgi.

Queremos, dentro de este apartado, reseñar algunas técnicas de histoquímica aplicada a microscopía electrónica, para poner de ma-

nifiesto la localización fina de diversas actividades enzimáticas que nos permiten confirmar las valoraciones realizadas a microscopía óptica.

Realizamos técnicas de enzimas de diferentes vías y localizaciones, así:

Dentro de la vía de la glicolisis anaerobia, la glucosa-6-fosfato.

- Deshidrogenasa, observando su actividad localizada en el hialoplasma como lo demuestran los precipitados electrodenso-
sos que marcan los lugares de localización de dicha
enzima (fig. 62, 64) y también observable en cuerpos
lisosómicos, lugar donde también se encuentra este
enzima (fig. 65).

Otro de los enzimas estudiados fué la Nicotinamida dinucleótido reducida (NADH) cuya actividad se localiza en hialoplasma y en menor cuantía en mitocondrias (fig. 66 y 67).

Dentro de las enzimas oxidativas se estudió la

- Citocromo-Oxidasa, mostrando su localización exuberante en las crestas mitocondriales que quedan perfectamente perfiladas enmarcando el lugar de localización enzimática (fig. 68-71).

Por último valoremos la LIPASA tisular, observando que se halla localizada fundamentalmente en el retículo liso siendo más prominente su localización alrededor de la gota lipídica en lo que hemos denominado la perigota (fig. 72-74) lo cual nos confirma una vez más, — que la localización está relacionada con la función.

RESULTADOS HISTOQUÍMICOS

La valoración enzimática de las diferentes enzimas estudiadas, las reunimos en los siguientes apartados:

I Enzimas y aminas comprometidas en la captación de ácidos grasos por el adipocito.

- Protein-lipasa o factor de aclaramiento
- Heparina mastocitaria.

II Enzimas citoplásmicas comprometidas en la lipogénesis.

- + Glucosa-6-fosfatasa
- Glucosa-6-Fosfato-Deshidrogenasa
- N A D H (Diaforasa)

III Enzimas mitocondriales

- a) Implicadas en la oxidación de ácidos grasos y Acetil CoA de otras vías en ciclo Krebs

- Succinato Deshidrogenasa
- Láctico Deshidrogenasa
- Mállico Deshidrogenasa

- b) Transferidasas de hidrógenos

- Diaforasa (NADH)

- c) Cadena respiratoria

- Citocromo oxidasa

IV Enzimas comprometidas en la lipolisis

- Esterasas no específicas
 - L-naftil esterasa
 - B-naftal esterasa
- Esterasas específicas
 - Lipasa tisular

V Enzimas no comprometidas directamente en la función del tejido adiposo pardo

- Fosfatasa ácida
- Fosfatasa alcalina
- Adenosin trifosfatasa

Capaces de medirnos respectivamente: actividad lisosomal y los mecanismos de transporte con y sin utilización energética.

La valoración de las distintas actividades enzimáticas expresadas en los cuadros anteriores, se han hecho siempre valorando las positivities sobre los cortes testigos incubados en ausencia de sustrato o en presencia de inhibidores del posible sustrato endógeno presente en el tejido; dentro de esta valoración para eliminar en lo posible interpretaciones subjetivas, hemos seleccionado de los varios cortes - incubados con sustrato varios de ellos al azar, en los cuales realizamos un conteo de gránulos por célula, a veces recurriendo al "objetivo de inmersión", para esta empresa. De acuerdo con el número de granulaciones de precipitado del producto, hemos empleado los signos de - cruces con el siguiente gradiente:

- (-) No presencia de precipitado, bien por carencia de sustrato endógeno o por la acción de inhibidores. Como en todos los casos, la acción enzimática de los cortes incubados con sustrato superó a los de los testigos, estos también son valorados con los mismos signos.
- (±) Significa casos dudosos de una posible difusión enzimática o utilización de otros sustratos competitivos para dicha enzima o bien de actividades mínimas, nunca superiores a un 5 % respecto al testigo.

(+)	Actividad superior a la del testigo en un 20 %
(++)	" " " " " " " " 40 %
(+++)	" " " " " " " " 60 %
(++++)	" " " " " " " " 80 %
(+++++)	" " " " " " " " 100 %

I Quadro representativo de la actividadGLUCOSA -6- FOSFATO DESHIDROGENASA

	<u>TAP Controles</u>		<u>TAP Inyectados</u>	
	<u>Con sustrato</u>	<u>Testigo</u>	<u>Con sustrato</u>	<u>Testigo</u>
Citoplasma	++	-	+++	-
Vesícula	-	-	-	-
Núcleo	-	-	-	-
Capilares	-	-	-	-
Endotelio	-	-	-	-
Vasos				
Músculo	+	-	+	-
T. A. Blanco	+	-	+	-
Músculo	++	-	++	-

(Fig. 75a y b)

II Quadro representativo de la actividadDIAFORASA (NADH)) CITOPLASMICA

	<u>TAP _Controles_</u>		<u>TAP _Inyectados_</u>	
	<u>Con substrato</u>	<u>Testigo</u>	<u>Con substrato</u>	<u>Testigo</u>
Citoplasma	+++	-	++	-
Vesículas	-	-	-	-
Núcleo	-	-	-	-
M. Plasmática	-	-	-	-
Capilares	+	-	+	-
Endotelio	±	-	±	-
Vasos	±	-	±	-
Músculo	±	-	±	-
T. A. Blanco	++	-	+	-
Músculo	+++	-	++	-

(Fig. 76a y b)

III Quadro representativo de la actividadSUCCINICO DESHIDROGENASA

	<u>TAP Controles</u>		<u>TAP Inyectados</u>	
	<u>Con substrato</u>	<u>Testigo</u>	<u>Con substrato</u>	<u>Testigo</u>
Citoplasma	+++	+	+++	+
Vesículas	±	-	±	-
Núcleo	-	-	-	-
M. Plasmática	-	-	-	-
Capilares	-	-	-	-
Endotelio	-	-	-	-
Vasos	-	-	-	-
Músculo	-	-	-	-
T. A. Blanco	++	-	+	-
Músculo	+++	-	+++	-

(Fig. 77a y b)

IV Quadro representativo de la actividad=LACTICO DESHIDROGENASA

	<u>IAP _Controles_</u>		<u>IAP _Inyectados_</u>	
	<u>Con substrato</u>	<u>Testigo</u>	<u>Con substrato</u>	<u>Testigo</u>
Citoplasma	++++	-	+++	-
Vesículas	+	-	-	-
Núcleo	-	-	-	-
M. Plasmática	+	-	-	-
Capilares	+	-	-	-
Endotelio	+++	-	++	-
Vasos				
Músculo	++	-	+++	-
T. A. Blanco	++	-	+	-
Músculo	++++	-	++++	-

(Fig. 78a y b, 79a y b)

V Quadro representativo de la actividadMALICO DESHIDROGENASA

	<u>IAP Controles</u>		<u>IAP Inyectados</u>	
	<u>Con sustrato</u>	<u>Testigo</u>	<u>Con sustrato</u>	<u>Testigo</u>
Citoplasma	+	+	+	+
Vesículas	+	-	-	-
Núcleo	-	-	-	-
M. Plasmática	-	-	-	-
Capilares	+	-	+	-
Endotelio	+	-	+	-
Vasos				
Músculo	+	+	+	+
T. A. Blanco	+	-	+	-
Músculo	+	+	+	+

(Fig. 80a y b)

VI Quadro representativo de la actividadDIAFORASA (NADH) MITOCONDRIAL

	<u>TAP Controles</u>		<u>TAP Inyectados</u>	
	<u>Con substrato</u>	<u>Testigo</u>	<u>Con substrato</u>	<u>Testigo</u>
Citoplasma	+	-	+	-
Vesículas	-	-	-	-
Núcleo	-	-	-	-
M. Plasmática	-	-	-	-
Capilares	+	-	+	-
Endotelio	+	-	+	-
Vasos	+	-	+	-
Músculo	+	-	+	-
T. A. Blanco	+	-	+	-
Músculo	+	-	+	-

(Fig. 81a y b)

VII Quadro representativo de la actividadCITOCROMO OXIDASA

	<u>TAP Controles</u>		<u>TAP Inyectados</u>	
	<u>Con substrato</u>	<u>Testigo</u>	<u>Con substrato</u>	<u>Testigo</u>
Citoplasma	+	-	+	-
Vesículas	-	-	-	-
Núcleo	-	-	-	-
M. Plasmática	-	-	-	-
Capilares	-	-	-	-
Endotelio	-	-	-	-
Vasos				
Músculo	+	-	+	-
T. A. Blanco	+	-	+	-
Músculo	+	-	+	-

(Fig. 82a y b)

VIII Quadro representativo de la actividadALFA-NAFTIL ESTERASA

	<u>IAP _Controles_</u>		<u>IAP _Inyectados_</u>	
	<u>Con substrato</u>	<u>Testigo</u>	<u>Con substrato</u>	<u>Testigo</u>
Citoplasma	+++	±	++++	±
Vesículas	-	-	-	-
Núcleo	±	-	±	-
M. Plasmática	±	-	±	-
Capilares	-	-	-	-
Endotelio	-	-	-	-
Vasos				
Músculo	++	-	+++	-
T. A. Blanco	++	-	+++	-
Músculo	+++	-	++++	-

(Fig. 83a y b, 84a y b)

IX Cuadro representativo de la actividadNAFTOL-AS ESTERASA

	<u>TAP Controles</u>		<u>TAP Inyectados</u>	
	<u>Con sustrato</u>	<u>Testigo</u>	<u>Con sustrato</u>	<u>Testigo</u>
Citoplasma	+++	±	++++	±
Vesículas	-	-	-	-
Núcleo	±	-	±	-
M. Plasmática	±	-	±	-
Capilares	±	-	±	-
Endotelio	±	-	±	-
Vasos				
Músculo	++	-	++	-
T. A. Blanco	+	-	++	-
Músculo	++	-	+++	-

(Fig. 85ayb)

X Quadro representativo de la actividadL I P A S AT
A

	<u>TAP _Controles</u>		<u>TAP _Inyectados</u>	
	<u>Con substrato</u>	<u>Testigo</u>	<u>Con substrato</u>	<u>Testigo</u>
Citoplasma	++	-	++++	-
Vesículas	-	-	-	-
Núcleo	-	-	-	-
M. Plasmática	-	-	-	-
Capilares	-	-	-	-
Endotelio	-	-	-	-
Vasos				
Músculo	-	-	-	-
T. A. Blanco	+	-	++	-
Músculo	++	-	++	-

(Fig. 86a y b, 87a y b)

[Quadro representativo de la actividad

FOSFATASA ACIDA

	<u>IAP Controles</u>		<u>IAP Inyectados</u>		ti
	<u>Con substrato</u>	<u>Testigo</u>	<u>Con substrato</u>	<u>Testigo</u>	
Citoplasma	++	-	++++	-	-
Vesículas	-	-	-	-	-
Núcleo	+	-	-	-	-
Capilares	+	-	+	-	-
Endotelio	+	-	++	-	-
Vasos					
Músculo	++	-	++++	-	-
T. A. Blanco	++	-	+++	-	-
Músculo	+++	-	++++	-	-

(Fig. 89a y b)

XII Quadro representativo de la actividadADENOSIN TRIFOSFATASA

	<u>IAP Controles</u>		<u>IAP Inyectados</u>	
	<u>Con substrato</u>	<u>Testigo</u>	<u>Con substrato</u>	<u>Testigo</u>
Citoplasma	++	-	+++	-
Vesículas	-	-	-	-
Núcleo	±	-	±	-
M. Plasmática	++	-	+++	-
Capilares	++	-	+++	-
Endotelio	++	-	+++	-
Vesos				
Músculo	++	-	+++	-
T. A. Blanco	+	-	+	-
Músculo	++	-	+++	-

(Fig. 89a y b)

XIII Quadro representativo de la actividadFOSFATASA ALCALINA

	<u>TAP _Controlles</u>		<u>TAP _Inyectados</u>	
	<u>Con substrato</u>	<u>Testigo</u>	<u>Con substrato</u>	<u>Testigo</u>
Citoplasma	-	-	-	-
Vesículas	-	-	-	-
Núcleo	-	-	-	-
M. Plasmática	-	-	-	-
Capilares	+	-	+	-
Endotelio	+	-	+	-
Vasos				
Músculo	-	-	-	-
T. A. Blanco	+	-	+	-
Músculo	-	-	-	-

(Fig. 90a y b, 91a y b)

RESULTADOS ESTADISTICOS
=====

Resultados obtenidos en las variaciones del peso corporal
y de la grasa perda interescapular en el transcurso de la
experiencia

TABLA DE RATAS CONTROLES

<u>Nº camada y orden</u>	<u>Nº permutación</u>	<u>Peso a los 5 días(g.)</u>	<u>Peso a los 21 días (g.)</u>	<u>Peso del BAT. (mg)</u>
I-1C	3	9,400	42,200	264,00
I-3C	7	9,150	41,000	282,00
I-4C	5	9,600	42,300	241,00
I-7C	1	9,000	43,400	275,50
II-9C	3	6,500	32,900	194,50
II-11C	7	7,000	36,500	211,00
II-13C	1	8,900	41,500	273,00
II-16C	5	8,500	41,900	253,50
III-17C	1	9,150	26,300	102,50
III-18C	5	10,410	31,500	127,00
III-19C	3	10,200	30,700	123,00
IV-23C	3	11,760	43,500	297,00
IV-27C	5	10,750	41,000	232,00
IV-28C	1	10,865	43,700	312,00
IV-30C	7	11,015	44,500	273,00

<u>Nº camada y orden</u>	<u>Nº permutación</u>	<u>Peso a los 5 días (g.)</u>	<u>Peso a los 21 días (g.)</u>	<u>Peso del BAT (mg)</u>
V-32C	7	11,350	35,260	264,00
V-33C	1	12,300	36,500	238,50
V-34C	3	10,200	47,700	261,00
VI-41C	7	11,900	20,170	114,00
VI-42C	3	10,000	16,000	125,00
VI-44C	9	7,000	36,000	198,00
VI-47C	1	7,560	19,000	150,00
VI-48C	5	10,500	33,300	270,00
VII-50C	9	14,750	49,500	271,00
VII-51C	5	15,000	55,500	312,00
VII-52C	1	14,700	42,200	330,00
VII-54C	7	14,800	38,570	245,00
VIII-58C	3	14,600	48,900	270,00
VIII-59C	7	15,660	53,500	312,00
VIII-60C	1	15,950	48,250	265,00
VIII-61C	5	16,740	51,750	310,00
IX-67C	1	8,800	34,500	213,00
IX-69C	3	6,920	20,250	100,00
IX-70C	5	7,750	22,500	135,00

TABLA DE RATAS INYECTADAS

<u>Nº camada y orden</u>	<u>Nº permutacion</u>	<u>Peso a los 5 días (g)</u>	<u>Peso a los 21 días (g)</u>	<u>Peso del BAT (mg)</u>
I-21	8	9,000	42,500	225,00
I-61	2	7,700	36,400	248,00
I-61	4	7,500	36,600	267,00
I-81	6	10,300	42,000	285,00
II-101	8	9,000	35,700	221,50
II-121	2	9,000	39,000	228,00
II-141	4	9,000	39,700	221,00
II-151	6	7,700	37,500	341,00
III-201	4	11,360	31,500	113,00
III-211	2	10,650	29,500	110,50
III-221	6	8,400	25,900	118,00
IV-241	2	12,635	46,600	296,00
IV-251	8	13,560	49,500	291,00
IV-261	4	12,580	48,000	280,00
IV-291	6	11,680	40,100	264,00
V-311	2	11,020	34,500	237,10
V-351	8	11,720	34,000	249,00
V-361	4	11,065	35,200	200,00
V-371	6	10,750	35,700	206,00

<u>Nº camada y orden</u>	<u>Nº permutacion</u>	<u>Peso a los 5 días (g)</u>	<u>Peso a los 21 días(g)</u>	<u>Peso del BAT (mg)</u>
VI-391	10	11,800	34,500	275,00
VI-401	2	10,800	25,000	191,00
VI-431	8	10,200	27,700	173,00
VI-451	4	11,350	33,700	285,00
VI-461	6	13,150	19,000	112,00
VII-491	6	15,300	36,500	233,00
VII-531	4	13,700	34,500	215,00
VII-551	2	13,550	33,100	243,00
VII-561	8	15,200	49,750	315,00
VIII-571	8	17,720	49,500	262,00
VIII-621	2	15,500	49,000	265,00
VIII-631	4	16,900	49,800	280,00
VIII-641	6	18,150	53,450	274,00
IX-651	4	13,000	34,500	245,00
IX-661	2	8,300	34,500	267,00
IX-681	6	8,750	34,700	248,00

Comparación de los pesos medios a los 21 días, entre
controles e inyectados.
Características de las muestras.

<u>P-21</u>	<u>Controles</u>	<u>P-21</u>	<u>Inyectados</u>
n	= 35	n	= 35
s_1^2	= 101,8851	s_1^2	= 65,3539
s_1	= 10,0938	s_1	= 8,0842
Cv	= 0,2664	Cv	= 0,2142

$$Z_0 = -0,0,640 \begin{pmatrix}) & L = 0,05 \\) & Z = 1,645 \end{pmatrix}$$

(Test unilateral)

Los pesos corporales de controles e inyectados no difieren significativamente en media. Aceptamos la hipótesis de que la cortisona no tiene efecto sobre el peso corporal a los 21 días. La probabilidad de error es $\beta = 0,05$, según el diseño.

Comparación de los pesos medios del B.A.T., entre
controles e inyectados, a los 21 días.

Características de las muestras.

<u>B.A.T.</u>	<u>CONTROLES</u>	<u>B.A.T.</u>	<u>INYECTADOS</u>
m_1	= 231,5829	m_2	= 236,6886
s_1^2	= 4670,8344	s_2^2	= 3228,3563
s_1	= 68,3435	s_2	= 56,8186
C_v	= 0,2951	C_v	= 0,2401

$$Z_0 = 0,3399 \begin{cases}) L = 0,05 \\) Z = 1,645 \end{cases}$$

Los pesos de los tejidos no difieren en media significativa
mente. Aceptamos la hipótesis de que la cortisona no tiene efecto sobre
el B.A.T., a los 21 días. La probabilidad de error, es según el diseño
 $\beta = 0,05$.

Estudio de las correlaciones entre el peso corporal
y el peso del B.A.T., de controles e inyectados.

Las dos comparaciones anteriores no tienen en cuenta las posibles correlaciones entre:

a) Controles:

Peso corporal 21 días ——— Peso del B.A.T. 21 d.

b) Inyectados:

Peso corporal 21 días ——— Peso del B.A.T. 21 d.

Realizamos una transformación de datos por logaritmicación decimal, para calcular el coeficiente de correlación entre controles e inyectados:

a) CONTROLES

Peso corporal (P)

Peso del B.A.T. (P.BAT)

$$m_1 = 1,5667$$

$$m_2 = 2,3586$$

$$s^2 = 0,0094$$

$$s^2 = 0,0160$$

$$s = 0,0972$$

$$s = 0,1266$$

$$C_v = 6,2 \%$$

$$C_v = 6,59 \%$$

$$C_{uv} (P; P.BAT) = 0,0179$$

$$r_1 = 0,8625$$

El valor r para $\alpha = 0,01$ y 33 grados de libertad es:
 $r = 0,4290$; y la hipótesis de correlación nula, debe ser rechazada.

b) INYECTADASPeso corporal (P)

$$m_1 = 1,5667$$

$$s^2 = 0,0094$$

$$s = 0,0972$$

$$C_v = 6,2 \%$$

Peso del B.A.T. (P.BAT)

$$m_2 = 2,3586$$

$$s^2 = 0,0160$$

$$s = 0,1266$$

$$C_v = 5,37 \%$$

$$C_{Bv} (P; P.BAT) = 0,0090$$

$$r_2 = 0,7314$$

Este valor (r) , supera el antes referido $r = 0,4290$ —
 para $\alpha = 0,01$ y 33 grados de libertad. En los animales inyectados,
 la hipótesis de ausencia de correlación debe ser rechazada.

Comparación de correlaciones entre peso corporal
y peso del B.A.T. en controles e inyectados.

La hipótesis nula de igualdad de coeficientes de correlación en la población control e inyectada es $H_0 \equiv \rho_1 = \rho_2$ contra la alternativa $H_1 \equiv \rho_1 \neq \rho_2$, la efectuamos mediante la transformación Z de Fisher:

$$r_1 = 0,8625 \quad \text{-----} \quad Z_1 = 1,3030$$

$$r_2 = 0,7314 \quad \text{-----} \quad Z_2 = 0,9317$$

$$\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = 1/32$$

$$Z_0 = 0,3713 / 0,2500 = 1,4852$$

Para $\alpha = 0,05$; $Z = 1,960$, la hipótesis de igualdad de correlaciones no puede ser rechazada.

Comparación bivalente de los vectores de medias
entre controles e inyectados.

La existencia de correlaciones tan significativas, obliga a efectuar un teste bivalente, que tenga en cuenta esta correlación entre las medias: Test de HOTELLING, para la comparación de vectores de medias de datos transformados por logaritimización decimal:

$$\begin{array}{ll} \text{a) Controles} & \vec{m}_1 = \begin{bmatrix} m_{11} \\ m_{12} \end{bmatrix} \quad \begin{matrix} g \\ mg \end{matrix} \\ \text{b) Inyectados} & \vec{m}_2 = \begin{bmatrix} m_{21} \\ m_{22} \end{bmatrix} \quad \begin{matrix} g \\ mg \end{matrix} \end{array}$$

Partiendo otra vez de la hipótesis:

$$H_0 \equiv \vec{\mu}_1 = \vec{\mu}_2 \quad ; \quad H_1 \equiv \vec{\mu}_1 \neq \vec{\mu}_2$$

a) CONTROLES:

$$n_1 = 35 \quad \vec{m}_1 = \begin{bmatrix} 1,5603 \\ 2,3413 \end{bmatrix} \quad A_1 = \begin{bmatrix} 0,6154 & 0,6086 \\ 0,6086 & 0,8092 \end{bmatrix}$$

b) INYECTADOS:

$$\begin{aligned} n_2 = 35 \quad \vec{m}_2 &= \begin{bmatrix} 1,5667 \\ 2,3586 \end{bmatrix} \quad A_2 = \begin{bmatrix} 0,3196 & 0,3060 \\ 0,3060 & 0,5440 \end{bmatrix} \\ \vec{m}_d &= \begin{bmatrix} 0,0064 \\ 0,0173 \end{bmatrix} \quad A = \begin{bmatrix} 0,9350 & 0,9146 \\ 0,9146 & 1,3532 \end{bmatrix} \end{aligned}$$

$F_0 = 0,1815$. Para $\alpha = 0,05$ y 2 y 67 grados de libertad

$$\text{da } F_{67}^2 = 19,48$$

Por tanto, debemos aceptar la hipótesis de igualdad de vectores de medias, resultado que confirma el obtenido mediante los dos tests univariantes.

De estos resultados expuestos, se puede deducir que:

- 1).- Las poblaciones de animales controles e inyectados en el orden de ideas, peso corporal a los 21 días, son equivalentes.
- 2).- Dichas poblaciones en cuanto al peso de S.A.T., a los 21 días, también son equivalentes.
- 3).- En la población "controles" hay una fuerte correlación entre el peso corporal y el peso del S.A.T.
- 4).- Ocurre lo mismo en la población "inyectada".
- 5).- Los coeficientes de correlación poblacionales, entre controles e inyectados, son equivalentes.
- 6).- La introducción de estas correlaciones en un test bivariante no pone de manifiesto la existencia de diferencias.
- 7).- La probabilidad de que no hayamos puesto de manifiesto una diferencia, entre controles e inyectados, que exista realmente, es muy pequeña ($\beta = 5\%$). La probabilidad de haberla descubierto, si realmente existiese es $1-\beta = 95\%$. Debemos aceptar, por tanto, la equivalencia de ambas poblaciones en esos dos órdenes de ideas.

La segunda parte de la valoración estadística consistirá en estudiar el diámetro de los adipocitos y el número de gotas de cada adipocito. Para la valoración de dichos parámetros hemos recurrido a la inclusión de las piezas de tejido adiposo pardo, según el método de rutina de microscopia electrónica, realizando cortes semifinos de una micra de espesor, que posteriormente eran contrastado con azul de metileno; de cada pieza se realizaron varios cortes, siempre separados por una distancia de 100 micras, para tener la seguridad de que no se repitiesen los mismos adipocitos, de esos cortes obtenidos se realizaron fotografías siempre con el mismo aumento y posteriormente ampliadas de modo que se nos transformaban las micras en centímetros para facilitar su medición y conteo. Los adipocitos elegidos eran aquellos que presentaban el núcleo bien patente, para estar seguros que siempre la valoración se realizaba en el plano ecuatorial de la célula. De cada rata se obtenían 10 preparaciones y de cada una se realizaba una fotografía de modo que al final contábamos 10 adipocitos, su diámetro y número de gotas, obteniendo las siguientes tablas.

TABLA DE CONTROLES
 =====

<u>Camada</u>	<u>rata</u>	<u>preparacion</u>	<u>diametro</u>	<u>nº gotas</u>
I	1	1	32	29
I	1	2	40	33
I	1	3	32	26
I	1	4	30	31
I	1	5	36	22
I	1	6	24	21
I	1	7	28	18
I	1	8	34	16
I	1	9	36	20
I	1	10	<u>31</u>	<u>20</u>
Medias.....			32,3	23,6

<u>Camada</u>	<u>rata</u>	<u>preparacion</u>	<u>díametro</u>	<u>nºgotas/adipocito</u>
I	3	1	35	28
I	3	2	32	31
I	3	3	33	32
I	3	4	29	32
I	3	5	30	26
I	3	6	32	40
I	3	7	29	36
I	3	8	30	27
I	3	9	30	28
I	3	10	<u>30</u>	<u>27</u>
Medias			31	31,7

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diámetro</u>	<u>Nºgotas/Adipocito</u>
I	4	1	31	23
I	4	2	31	28
I	4	3	29	32
I	4	4	25	25
I	4	5	31	34
I	4	6	28	21
I	4	7	32	38
I	4	8	25	15
I	4	9	30	24
I	4	10	<u>27</u>	<u>38</u>
Medias			28,9	27,8

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diámetro</u>	<u>Nº gotas/Adipocito</u>
I	7	1	34	31
I	7	2	31	29
I	7	3	33	37
I	7	4	34	34
I	7	5	40	37
I	7	6	20	35
I	7	7	30	32
I	7	8	28	37
I	7	9	27	30
I	7	10	<u>28</u>	<u>37</u>
Medias			30,5	33,9

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/Adipocito</u>
II	9	1	26	36
II	9	2	28	37
II	9	3	25	31
II	9	4	26	27
II	9	5	32	31
II	9	6	30	32
II	9	7	26	32
II	9	8	23	24
II	9	9	22	23
II	9	10	<u>31</u>	<u>33</u>
Medias			25,9	30,6

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocito</u>
II	11	1	36	32
II	11	2	28	22
II	11	3	25	22
II	11	4	22	21
II	11	5	25	18
II	11	6	20	26
II	11	7	30	29
II	11	8	30	16
II	11	9	40	37
II	11	10	<u>29</u>	<u>40</u>
Medias			28,5	26,3

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparación</u>	<u>Diámetro</u>	<u>Nº gotas/adipocito</u>
II	13	1	26	27
II	13	2	26	28
II	13	3	27	29
II	13	4	25	27
II	13	5	29	28
II	13	6	27	30
II	13	7	26	27
II	13	8	30	26
II	13	9	30	28
II	13	10	<u>27</u>	<u>27</u>
Medias			27,3	27,7

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparación</u>	<u>Diámetro</u>	<u>Nº gotas/adipocito</u>
II	16	1	32	27
II	16	2	23	29
II	16	3	27	26
II	16	4	31	19
II	16	5	24	26
II	16	6	24	24
II	16	7	21	25
II	16	8	29	26
II	16	9	29	22
II	16	10	<u>26</u>	<u>28</u>
Medias			26,6	25,2

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocito</u>
III	17	1	25	20
III	17	2	25	27
III	17	3	35	34
III	17	4	27	27
III	17	5	34	31
III	17	6	30	29
III	17	7	22	20
III	17	8	27	23
III	17	9	25	20
III	17	10	<u>23</u>	<u>23</u>
Medias			27,3	25,4

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocito</u>
III	18	1	29	20
III	18	2	33	22
III	18	3	36	29
III	18	4	30	33
III	18	5	31	25
III	18	6	28	37
III	18	7	31	34
III	18	8	26	37
III	18	9	32	24
III	18	10	<u>22</u>	<u>37</u>
Medias			29,8	29,8

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>nº gotas/adipocito</u>
III	19	1	23	26
III	19	2	31	24
III	19	3	26	28
III	19	4	30	24
III	19	5	23	30
III	19	6	27	23
III	19	7	33	21
III	19	8	24	28
III	19	9	30	28
III	19	10	<u>26</u>	<u>28</u>
Medias			27,3	26,0

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocito</u>
IV	23	1	34	25
IV	23	2	23	22
IV	23	3	16	31
IV	23	4	28	28
IV	23	5	21	34
IV	23	6	35	27
IV	23	7	31	31
IV	23	8	22	26
IV	23	9	36	26
IV	23	10	<u>37</u>	<u>25</u>
Medias			28,3	27,5

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
IV	27	1	25	21
IV	27	2	30	24
IV	27	3	25	29
IV	27	4	22	22
IV	27	5	22	23
IV	27	6	29	33
IV	27	7	25	31
IV	27	8	26	30
IV	27	9	27	21
IV	27	10	<u>26</u>	<u>24</u>
Medias			25,7	25,8

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocito</u>
IV	28	1	26	30
IV	28	2	26	18
IV	28	3	30	22
IV	28	4	34	20
IV	28	5	27	22
IV	28	6	25	34
IV	28	7	24	27
IV	28	8	27	27
IV	28	9	30	31
IV	28	10	<u>25</u>	<u>27</u>
Medias			27,4	25,1

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
IV	30	1	35	37
IV	30	2	37	23
IV	30	3	30	27
IV	30	4	24	22
IV	30	5	34	39
IV	30	6	29	21
IV	30	7	36	37
IV	30	8	29	30
IV	30	9	28	33
IV	30	10	<u>30</u>	<u>34</u>
Medias			31,2	30,3

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>nº gotas/adipocitos</u>
V	32	1	26	28
V	32	2	30	27
V	32	3	28	27
V	32	4	31	31
V	32	5	22	27
V	32	6	28	32
V	32	7	28	40
V	32	8	25	33
V	32	9	31	29
V	32	10	<u>25</u>	<u>29</u>
Medias			27,4	30,3

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/ adipocitos</u>
V	33	1	27	24
V	33	2	27	29
V	33	3	26	30
V	33	4	29	38
V	33	5	29	40
V	33	6	32	37
V	33	7	24	30
V	33	8	26	32
V	33	9	25	34
V	33	10	<u>23</u>	<u>30</u>
Medias			26,8	32,4

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
V	34	1	30	33
V	34	2	29	32
V	34	3	25	28
V	34	4	28	25
V	34	5	30	40
V	34	6	25	27
V	34	7	33	34
V	34	8	25	31
V	34	9	28	28
V	34	10	<u>29</u>	<u>40</u>
Medias			28,2	31,8

<u>Canada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
V	38	1	21	29
V	38	2	27	29
V	38	3	30	27
V	38	4	25	28
V	38	5	30	27
V	38	6	23	28
V	38	7	25	24
V	38	8	31	24
V	38	9	28	32
V	38	10	<u>33</u>	<u>30</u>
Medias			27,8	27,8

<u>Canada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
VI	41	1	32	35
VI	41	2	28	40
VI	41	3	29	30
VI	41	4	30	27
VI	41	5	28	30
VI	41	6	30	33
VI	41	7	31	24
VI	41	8	31	28
VI	41	9	29	27
VI	41	10	<u>33</u>	<u>30</u>
Medias			30,2	30,3

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
VI	42	1	29	25
VI	42	2	31	37
VI	42	3	30	39
VI	42	4	37	40
VI	42	5	27	27
VI	42	6	34	40
VI	42	7	31	34
VI	42	8	30	31
VI	42	9	26	31
VI	42	10	<u>32</u>	<u>40</u>
		Medias	31,1	34,4

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocito</u>
VI	44	1	29	25
VI	44	2	31	37
VI	44	3	24	36
VI	44	4	24	20
VI	44	5	20	24
VI	44	6	28	32
VI	44	7	25	19
VI	44	8	29	24
VI	44	9	28	25
VI	44	10	<u>24</u>	<u>39</u>
		Medias	26,2	28,1

<u>Gemada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
VI	47	1	30	40
VI	47	2	25	30
VI	47	3	20	36
VI	47	4	25	37
VI	47	5	29	37
VI	47	6	30	26
VI	47	7	24	20
VI	47	8	23	20
VI	47	9	27	24
VI	47	10	<u>25</u>	<u>21</u>
		Medias	25,8	29,1

<u>Gemada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
VI	48	1	30	27
VI	48	2	22	30
VI	48	3	32	35
VI	48	4	30	35
VI	48	5	22	36
VI	48	6	26	32
VI	48	7	29	29
VI	48	8	30	30
VI	48	9	28	30
VI	48	10	<u>26</u>	<u>29</u>
		Medias.....	27,5	31,3

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preperacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
VII	50	1	25	28
VII	50	2	29	30
VII	50	3	28	30
VII	50	4	25	30
VII	50	5	26	16
VII	50	6	31	28
VII	50	7	25	3k
VII	50	8	30	29
VII	50	9	26	31
VII	50	10	<u>26</u>	<u>30</u>
Medias:			27,1	27,8

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preperacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
VII	51	1	36	38
VII	51	2	27	22
VII	51	3	26	19
VII	51	4	31	25
VII	51	5	24	34
VII	51	6	28	25
VII	51	7	24	22
VII	51	8	25	30
VII	51	9	29	19
VII	51	10	<u>25</u>	<u>25</u>
Medias			27,0	25,9

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>nº gotas/adipocitos</u>
VII	52	1	30	27
VII	52	2	27	29
VII	52	3	25	20
VII	52	4	26	27
VII	52	5	30	31
VII	52	6	28	28
VII	52	7	27	27
VII	52	8	26	30
VIII	52	9	25	27
VII	52	10	<u>25</u>	<u>36</u>
Medias			26,9	28,2

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
VII	54	1	32	35
VII	54	2	28	29
VII	54	3	30	40
VII	54	4	30	27
VII	54	5	28	30
VII	54	6	30	33
VII	54	7	31	24
VII	54	8	31	38
VII	54	9	29	27
VII	54	10	<u>33</u>	<u>30</u>
Medias			30,2	31,3

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
VIII	58	1	29	25
VIII	58	2	31	37
VIII	58	3	30	39
VIII	58	4	37	40
VIII	58	5	27	27
VIII	58	6	34	40
VIII	58	7	31	34
VIII	58	8	34	31
VIII	58	9	26	31
VIII	58	10	<u>32</u>	<u>40</u>
Medias			31,1	34,4

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
VIII	59	1	28	18
VIII	59	2	32	30
VIII	59	3	30	23
VIII	59	4	33	35
VIII	59	5	28	26
VIII	59	6	25	28
VIII	59	7	27	27
VIII	59	8	31	17
VIII	59	9	26	39
VIII	59	10	<u>26</u>	<u>20</u>
Medias			28,6	26,3

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
VIII	60	1	25	17
VIII	60	2	26	21
VIII	60	3	23	28
VIII	60	4	26	40
VIII	60	5	23	33
VIII	60	6	33	24
VIII	60	7	24	22
VIII	60	8	19	22
VIII	60	9	31	28
VIII	60	10	<u>23</u>	<u>20</u>
Medias			25,4	25,5

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
VIII	61	1	30	37
VIII	61	2	24	24
VIII	61	3	30	29
VIII	61	4	30	31
VIII	61	5	35	29
VIII	61	6	27	27
VIII	61	7	28	27
VIII	61	8	27	26
VIII	61	9	29	40
VIII	61	10	<u>30</u>	<u>25</u>
Medias			29,0	29,5

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
IX	67	1	21	28
IX	67	2	30	29
IX	67	3	30	27
IX	67	4	25	33
IX	67	5	23	30
IX	67	6	26	28
IX	67	7	31	35
IX	67	8	24	24
IX	67	9	25	26
IX	67	10	<u>24</u>	<u>27</u>
Medias			25,5	28,7

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
IX	68	1	32	35
IX	68	2	24	28
IX	68	3	26	24
IX	68	4	29	33
IX	68	5	29	31
IX	68	6	29	32
IX	68	7	30	27
IX	68	8	28	22
IX	68	9	23	28
IX	68	10	<u>28</u>	<u>29</u>
Medias			27,8	28,9

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
IX	70	1	31	22
IX	70	2	32	33
IX	70	3	35	23
IX	70	4	33	28
IX	70	5	30	32
IX	70	6	38	30
IX	70	7	29	23
IX	70	8	28	32
IX	70	9	29	31
IX	70	10	<u>29</u>	<u>32</u>
Medias.....			31,4	28,6

TABLA DE INYECTADOS

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
I	2	1	31	24
I	2	2	27	21
I	2	3	30	16
I	2	4	28	19
I	2	5	31	22
I	2	6	29	21
I	2	7	28	13
I	2	8	27	20
I	2	9	29	19
I	2	10	<u>32</u>	<u>25</u>
Medias			29,2	20,0

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
I	5	1	34	10
I	5	2	28	17
I	5	3	32	13
I	5	4	27	14
I	5	5	27	22
I	5	6	30	21
I	5	7	29	18
I	5	8	33	18
I	5	9	34	22
I	5	10	<u>30</u>	<u>21</u>
Medias			30,4	17,6

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
I	6	1	32	17
I	6	2	29	16
I	6	3	25	19
I	6	4	29	14
I	6	5	28	18
I	6	6	30	20
I	6	7	32	26
I	6	8	30	19
I	6	9	28	19
I	6	10	<u>27</u>	<u>24</u>
Medias			29,0	19,2

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
I	8	1	25	19
I	8	2	26	16
I	8	3	27	21
I	8	4	23	10
I	8	5	32	15
I	8	6	31	14
I	8	7	24	16
I	8	8	20	10
I	8	9	27	20
I	8	10	<u>23</u>	<u>16</u>
Medias			25,8	15,7

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparación</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
II	10	1	29	24
II	10	2	30	23
II	10	3	28	25
II	10	4	30	10
II	10	5	29	19
II	10	6	32	22
II	10	7	29	17
II	10	8	25	16
II	10	9	32	11
II	10	10	<u>30</u>	<u>15</u>
Medias			29,4	18,2

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparación</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
II	12	1	30	14
II	12	2	30	8
II	12	3	29	6
II	12	4	25	12
II	12	5	29	12
II	12	6	26	17
II	12	7	29	23
II	12	8	25	18
II	12	9	26	18
II	12	10	<u>30</u>	<u>9</u>
Medias			27,9	13,7

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preposicion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
II	14	1	25	21
II	14	2	28	12
II	14	3	31	23
II	14	4	29	20
II	14	5	32	24
II	14	6	29	18
II	14	7	30	15
II	14	8	32	10
II	14	9	30	15
II	14	10	<u>32</u>	<u>18</u>
Medias			29,8	17,6

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preposicion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
II	15	1	26	21
II	15	2	30	23
II	15	3	23	14
II	15	4	29	18
II	15	5	25	14
II	15	6	26	25
II	15	7	30	10
II	15	8	23	20
II	15	9	24	19
II	15	10	<u>25</u>	<u>22</u>
Medias			26,1	18,6

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
III	20	1	34	19
III	20	2	33	20
III	20	3	33	17
III	20	4	34	14
III	20	5	26	32
III	20	6	32	16
III	20	7	33	15
III	20	8	23	18
III	20	9	27	17
III	20	10	<u>32</u>	<u>19</u>
		Medias.....	30,7	18,7

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
III	21	1	25	21
III	21	2	25	20
III	21	3	26	18
III	21	4	35	15
III	21	5	26	26
III	21	6	23	15
III	21	7	24	27
III	21	8	30	17
III	21	9	23	18
III	21	10	<u>25</u>	<u>15</u>
		Medias	26,2	19,2

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preperacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
III	22	1	28	12
III	22	2	28	11
III	22	3	31	13
III	22	4	29	16
III	22	5	25	20
III	22	6	25	17
III	22	7	27	19
III	22	8	25	16
III	22	9	23	18
III	22	10	<u>22</u>	<u>13</u>
Medias			26,3	15,5

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
IV	24	1	36	11
IV	24	2	30	24
IV	24	3	26	19
IV	24	4	32	23
IV	24	5	28	26
IV	24	6	35	24
IV	24	7	26	20
IV	24	8	30	19
IV	24	9	29	10
IV	24	10	<u>27</u>	<u>22</u>
Medias			29,9	19,8

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
IV	25	1	32	20
IV	25	2	28	23
IV	25	3	28	20
IV	25	4	25	16
IV	25	5	27	18
IV	25	6	27	17
IV	25	7	24	21
IV	25	8	32	18
IV	25	9	25	26
IV	25	10	<u>25</u>	<u>14</u>
Medias			27,1	19,3

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
IV	26	1	34	21
IV	26	2	30	30
IV	26	3	28	16
IV	26	4	27	17
IV	26	5	26	18
IV	26	6	33	15
IV	26	7	26	17
IV	26	8	28	18
IV	26	9	25	14
IV	26	10	<u>24</u>	<u>15</u>
Medias			28,1	18,1

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
IV	29	1	25	12
IV	29	2	25	15
IV	29	3	25	19
IV	29	4	25	19
IV	29	5	32	22
IV	29	6	25	15
IV	29	7	26	16
IV	29	8	25	14
IV	29	9	26	12
IV	29	10	<u>23</u>	<u>18</u>
		Medias	26,7	16,2

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
V	31	1	29	18
V	31	2	24	16
V	31	3	27	17
V	31	4	23	12
V	31	5	26	13
V	31	6	29	21
V	31	7	26	13
V	31	8	26	18
V	31	9	26	16
V	31	10	<u>32</u>	<u>15</u>
		Medias	26,8	15,9

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
V	35	1	33	22
V	35	2	34	15
V	35	3	28	23
V	35	4	35	32
V	35	5	32	12
V	35	6	30	21
V	35	7	37	18
V	35	8	37	24
V	35	9	39	19
V	35	10	<u>27</u>	<u>10</u>
Medias			32,2	19,6

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
V	36	1	25	14
V	36	2	25	19
V	36	3	26	17
V	36	4	29	20
V	36	5	26	16
V	36	6	23	13
V	36	7	27	12
V	36	8	24	14
V	36	9	26	13
V	36	10	<u>32</u>	<u>15</u>
Medias			26,3	15,3

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
V	37	1	29	20
V	37	2	27	18
V	37	3	31	22
V	37	4	30	20
V	37	5	30	10
V	37	6	24	11
V	37	7	27	19
V	37	8	29	20
V	37	9	26	18
V	37	10	<u>26</u>	<u>17</u>
Medias			27,9	17,5

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
VI	39	1	26	25
VI	39	2	23	19
VI	39	3	32	14
VI	39	4	31	19
VI	39	5	27	15
VI	39	6	33	16
VI	39	7	26	22
VI	39	8	24	18
VI	39	9	29	18
VI	39	10	<u>24</u>	<u>13</u>
Medias			27,5	17,9

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
VI	40	1	25	18
VI	40	2	27	20
VI	40	3	21	13
VI	40	4	26	17
VI	40	5	22	15
VI	40	6	25	20
VI	40	7	30	21
VI	40	8	26	16
VI	40	9	24	15
VI	40	10	<u>20</u>	<u>12</u>
Medias			24,6	16,7

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
VI	43	1	22	18
VI	43	2	24	20
VI	43	3	27	18
VI	43	4	22	15
VI	43	5	30	25
VI	43	6	24	9
VI	43	7	34	12
VI	43	8	23	19
VI	43	9	25	15
VI	43	10	<u>29</u>	<u>15</u>
Medias			26,0	16,6

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nºgotas/adipocitos</u>
VI	45	1	24	18
VI	45	2	30	23
VI	45	3	31	12
VI	45	4	24	14
VI	45	5	23	11
VI	45	6	22	16
VI	45	7	21	17
VI	45	8	30	19
VI	45	9	22	20
VI	45	10	<u>27</u>	<u>14</u>
Medias			25,4	16,4

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nºgotas/adipocitos</u>
VI	46	1	24	15
VI	46	2	26	22
VI	46	3	25	18
VI	46	4	33	17
VI	46	5	23	15
VI	46	6	26	16
VI	46	7	23	19
VI	46	8	26	17
VI	46	9	25	19
VI	46	10	<u>27</u>	<u>18</u>
Medias			25,8	17,6

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
VII	49	1	20	14
VII	49	2	26	15
VII	49	3	23	18
VII	49	4	30	24
VII	49	5	31	16
VII	49	6	24	16
VII	49	7	26	15
VII	49	8	29	18
VII	49	9	20	10
VII	49	10	<u>27</u>	<u>13</u>
Medias			25,6	15,9

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
VII	53	1	27	18
VII	53	2	23	20
VII	53	3	33	14
VII	53	4	27	23
VII	53	5	25	28
VII	53	6	30	22
VII	53	7	27	23
VII	53	8	28	22
VII	53	9	25	18
VII	53	10	<u>28</u>	<u>17</u>
Medias			27,3	20,5

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diámetro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
VII	55	1	29	22
VII	55	2	23	15
VII	55	3	29	18
VII	55	4	28	16
VII	55	5	25	14
VII	55	6	27	23
VII	55	7	26	19
VII	55	8	24	17
VII	55	9	26	19
VII	55	10	<u>27</u>	<u>14</u>
Medias			26,4	17,7

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diámetro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
VII	56	1	27	19
VII	56	2	25	13
VII	56	3	26	15
VII	56	4	25	15
VII	56	5	25	19
VII	56	6	29	10
VII	56	7	27	15
VII	56	8	25	12
VII	56	9	30	20
VII	56	10	<u>22</u>	<u>17</u>
Medias.....			26,2	15,5

<u>Canada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nºgotas/adipocitos</u>
VIII	57	1	24	16
VIII	57	2	23	16
VIII	57	3	29	15
VIII	57	4	24	7
VIII	57	5	22	12
VIII	57	6	22	16
VIII	57	7	24	17
VIII	57	8	32	16
VIII	57	9	25	17
VIII	57	10	<u>26</u>	<u>23</u>
Medias			25,1	15,5

<u>Canada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nºgotas/adipocitos</u>
VIII	62	1	25	17
VIII	62	2	27	19
VIII	62	3	26	22
VIII	62	4	27	15
VIII	62	5	27	21
VIII	62	6	26	19
VIII	62	7	26	16
VIII	62	8	21	13
VIII	62	9	20	16
VIII	62	10	<u>33</u>	<u>14</u>
Medias			25,8	18,2

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
VIII	63	1	29	18
VIII	63	2	25	15
VIII	63	3	31	14
VIII	63	4	30	14
VIII	63	5	37	13
VIII	63	6	30	17
VIII	63	7	31	14
VIII	63	8	29	15
VII	63	9	31	14
VII	63	10	<u>32</u>	<u>12</u>
Medias			30,5	14,6

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
VIII	64	1	28	16
VIII	64	2	26	20
VIII	64	3	27	15
VIII	64	4	32	13
VIII	64	5	26	18
VIII	64	6	23	11
VIII	64	7	24	15
VIII	64	8	25	19
VIII	64	9	25	14
VIII	64	10	<u>26</u>	<u>13</u>
Medias			26,2	15,4

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
IX	65	1	27	14
IX	65	2	28	19
IX	65	3	24	16
IX	65	4	30	16
IX	65	5	27	13
IX	65	6	26	14
IX	65	7	23	18
IX	65	8	24	10
IX	65	9	25	17
IX	65	10	<u>29</u>	<u>20</u>
Medias			26,3	15,8

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nº gotas/adipocitos</u>
IX	66	1	30	15
IX	66	2	20	9
IX	66	3	27	15
IX	66	4	27	12
IX	66	5	24	18
IX	66	6	27	16
IX	66	7	28	9
IX	66	8	28	16
IX	66	9	30	18
IX	66	10	<u>26</u>	<u>13</u>
Medias			26,7	14,1

<u>Camada</u>	<u>Rata</u>	<u>Preparacion</u>	<u>Diametro</u>	<u>Nºgotas/adipocitos</u>
IX	68	1	30	14
IX	68	2	29	17
IX	68	3	25	20
IX	68	4	30	17
IX	68	5	26	18
IX	68	6	25	18
IX	68	7	26	13
IX	68	8	25	23
IX	68	9	24	18
IX	68	10	<u>20</u>	<u>9</u>
Medias			26,0	16,7

Test de la comprobación de las poblaciones controlas e inyectados, según dos variantes:

- Diámetro de los adipocitos y
- N° de gotas.

Si la media poblacional de controlas es: $\vec{\mu}_1 = \begin{bmatrix} \mu_{11} \\ \mu_{12} \end{bmatrix}$

y la de inyectados es: $\vec{\mu}_2 = \begin{bmatrix} \mu_{11} \\ \mu_{12} \end{bmatrix}$ el test, somete a prueba las —

siguientes hipótesis bivariantes:

$$H_0 = \vec{\mu}_1 = \vec{\mu}_2 \quad ; \quad H_1 = \vec{\mu}_1 \neq \vec{\mu}_2$$

El muestreo aleatorio llevado a cabo en 35 controlas con 10 preparaciones por animal, según los datos adjuntos, proporcionan la matriz:

32,3	31	28,9	30,5	27,3	29,8	27,3	28,3
23,6	31,7	27,8	30,5	25,4	29,8	26,0	27,5

Cuya primera fila se refiere a "diámetros" y la segunda — a "N° de gotas".

Para el cálculo de la correlación entre los datos de la matriz de suma de cuadrados, el producto de desviaciones y el vector de medias muestral, se utilizarán en el siguiente programa, en una calculadora — "Hewlett-Packard", HP 25:

Cálculo de r y de la matriz de SCD y SPD y \overline{m}_1

1	$\frac{1}{4}$	13	\div	25	RCL 3
2	gx^2	14	—	26	\div
3	STO \div 0	15	STO 5	27	CHS
4	\downarrow	16	RCL 6	28	RCL 0
5	\rightleftarrows	17	RCL 7	29	\div
6	$\Sigma \div$	18	gx^2	30	STO 0
7	GTO 00	19	RCL 3	31	x
8	RCL 5	20	\div	32	$\frac{1}{2} \sqrt{x}$
9	RCL 7	21	—	33	\div
10	RCL 4	22	STO 6	34	STO 1
11	x	23	RCL 4	35	GTO 00
12	RCL 3	24	gx^2		

Pulsaciones

X_1
 $\boxed{\text{ENTER}}$
 Y_1
 $\frac{1}{4}$ PROG.
 R/S
 S OLO f. PROG. para el 1^{er} par
 — . —
 GTO 08
 R/S
 En pantalla : r

Registros

R_7 Σx
 R_6 $\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}$
 R_5 $\Sigma xy - \frac{\Sigma x \Sigma y}{n}$
 R_4 Σy
 R_3 n
 R_2 vacío
 R_1 r
 R_0 $\Sigma y^2 - \frac{(\Sigma y)^2}{n}$

Obtenemos:

$$r = 0,3808$$

$$A_1 = \begin{bmatrix} 126,3069 & 69,5180 \\ 69,5180 & 263,8560 \end{bmatrix}$$

$$\vec{a}_1 = \begin{bmatrix} 28,2543 \\ 28,7800 \end{bmatrix}$$

El muestreo aleatorio llevado a cabo en el grupo de "inyectados", efectuado de igual modo que en controles, proporciona la siguiente matriz:

$$\begin{bmatrix} 29,20 & 30,40 & 29,00 & \dots & 26,30 & 29,90 \\ 20,00 & 17,60 & 19,20 & \dots & 15,50 & 19,80 \end{bmatrix}$$

Que con el programa anterior, da:

$$r = 0,4034$$

$$A_2 = \begin{bmatrix} 119,2469 & 45,3951 \\ 45,3951 & 106,1789 \end{bmatrix}$$

$$\vec{a}_2 = \begin{bmatrix} 27,3543 \\ 17,1657 \end{bmatrix}$$

Estudiaremos la normalidad biveriante de "diámetro" "nº de gotas", en controles e inyectados, mediante la prueba gráfica en la mitad superior del diagrama Probit relativo a las distancias de Mahalanobis, calculadas con un programa en la HP - 25:

Prueba gráfica de normalidad biveriante. Cálculo de distancias de Mahalanobis.

Sean n individuos $\vec{x}_{ij}, \vec{x}_{ij} = \begin{bmatrix} x_{i1} \\ x_{i2} \end{bmatrix}$

$$i = 1, \dots, n$$

$$j = 1, 2$$

su media $\vec{m} = \begin{bmatrix} m_1 \\ m_2 \end{bmatrix}$ y su matriz de SCD y SPD

$$A = \begin{bmatrix} \sum x_{i1}^2 - \frac{(\sum x_{i1})^2}{n} & \sum x_{i1} x_{i2} - \frac{(\sum x_{i1})(\sum x_{i2})}{n} \\ \sum x_{i1} x_{i2} - \frac{(\sum x_{i1})(\sum x_{i2})}{n} & \sum x_{i2}^2 - \frac{(\sum x_{i2})^2}{n} \end{bmatrix}$$

El programa calcula

$$D = \sqrt{(n-1) (\vec{x}_{ij} - \vec{m})^T A^{-1} (\vec{x}_{ij} - \vec{m})} = \sqrt{(n-1) z^2}$$

para cada vector $\vec{X_{ij}}$ de la muestra

1 STO 1	17 STO -7	33 RCL 2
2 \longleftrightarrow	18 1	34 *
3 STO 3	19 STO -7	35 2
4 x	20 R/S	36 x
5 \longleftrightarrow	21 RCL 5	37 \downarrow
6 STO 2	22 —	38 Gx^2
7 GTX^2	23 \longleftrightarrow	39 \longleftrightarrow
8 —	24 RCL 4	40 \downarrow
9 $g x = 0$	25 —	41 RCL 1
10 STO 20	26 \uparrow	42 x
11 STO 0	27 Gx^2	43 \downarrow
12 STO $\div 1$	28 RCL 3	44 \downarrow
13 STO $\div 3$	29 x	45 STO 6
14 CHS	30 \downarrow	46 RCL 7
15 STO $\div 2$	31 \longleftrightarrow	47 x
16 \downarrow	32 x	48 $f \sqrt{x}$
		49 R/S

Pulsaciones m_1

STO 4

 m_2

STO 5

n

ENTER

 a_{12}

ENTER

 a_{11}

↑ PROG.

R/S

— . —

 x_{11}

ENTER

 x_{12}

GTO 21

R/S

En pantalla 0

Para cada vector repetir:

 x_{11}

ENTER

 x_{12}

GTO 21

R/S

Registros R_7 n - 1 R_6 z^2 R_5 m_2 R_4 m_1 R_3 a_{11} R_2 a_{12} R_1 a_{22} R_0 det. A

Comprobación del programa:

81

$$n = 15, \quad \vec{m} = \begin{bmatrix} 1 \\ 2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} m_1 \\ m_2 \end{bmatrix}$$

$$\vec{x} = \begin{bmatrix} 8 \\ 3 \end{bmatrix} \quad A = \begin{bmatrix} 1 & 2 \\ 2 & 5 \end{bmatrix}$$

Se obtiene:

$$D = 21,82$$

$$z^2 = 34$$

CONTROLES:

Distancias de Mahalanobis:

3,56;	1,53;	0,62;	1,21;	1,72;	1,02;	1,46;
1,32;	1,53;	0,89;	1,78;	1,18;	0,53;	1,02;
2,16;	1,08;	1,43;	1,20;	0,61;	1,07;	0,71;
1,16;	1,16;	1,05;	1,62;	0,41;	1,31;	0,28;
1,79;	0,54;	1,35;	1,21;	0,80;	1,01;	0,51;

Ordenacion y Frecuencias acumuladas

0,28	0,80	1,16		1,43	0,71
0,41	0,89	1,18	0,51	1,46	0,74
0,51	1,01	1,20	0,54	1,53	0,77
0,53	1,02	1,21	0,57	1,53	0,80
0,54	1,02	1,21	0,57	1,62	0,83
0,61	1,05	1,31	0,60	1,72	0,86
0,62	1,07	1,32	0,63	1,79	0,89
0,71	1,08	1,35	0,69	1,87	0,91
				2,16	0,97
				2,16	0,97
				3,56	1,00

INYECTADOS:

Distancias de Mahalanobis

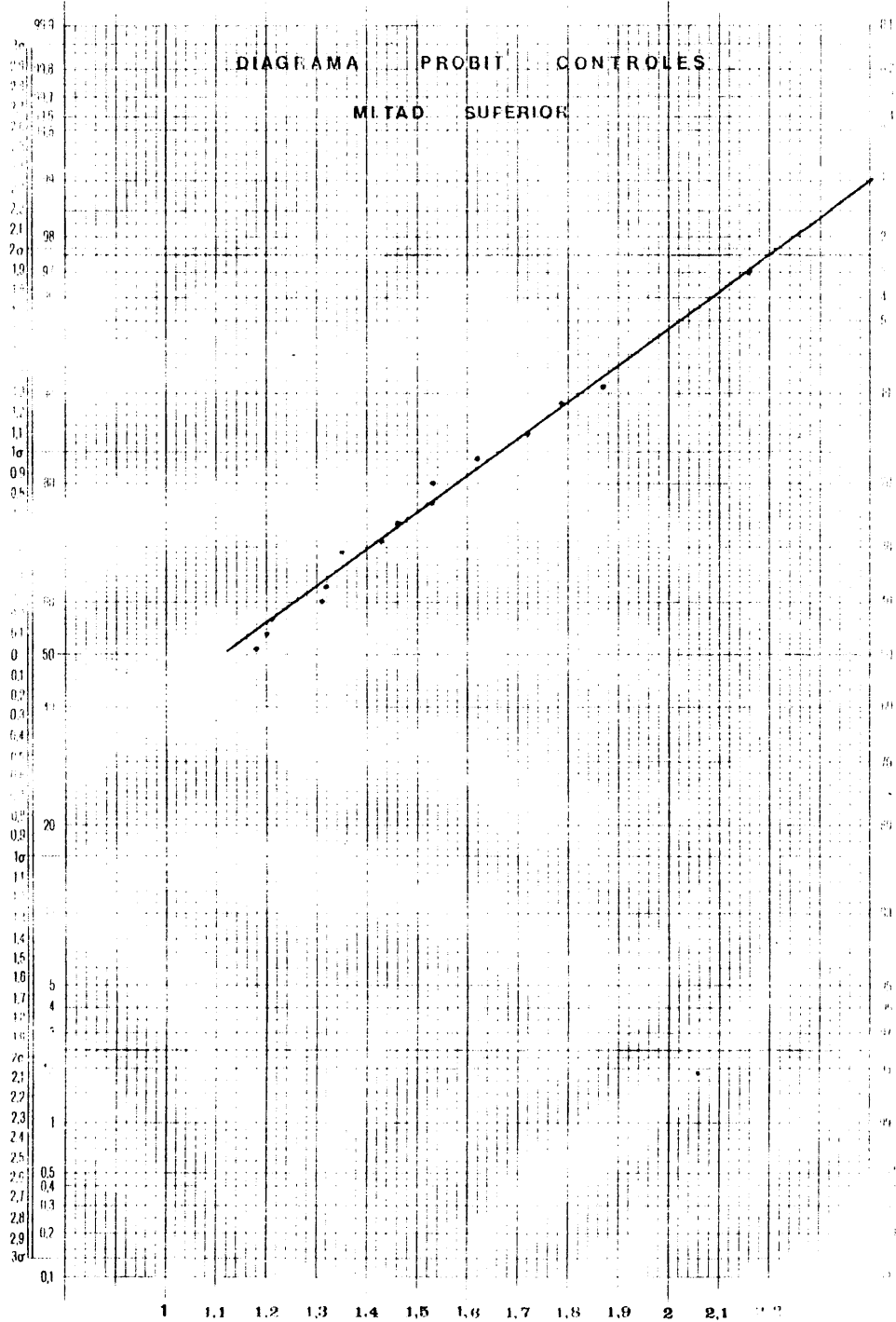
1,65;	1,69;	1,24;	0,99;	1,10;	2,29;	2,08;
0,75;	0,98;	1,30;	1,30;	2,87;	1,33;	0,57;
0,56;	0,72;	2,61;	1,07;	0,30;	0,43;	0,72;
1,04;	1,04;	1,01;	1,03;	0,82;	1,78;	0,72;
1,51;	1,34;	1,36;	1,79;	1,65;	0,96;	1,71.

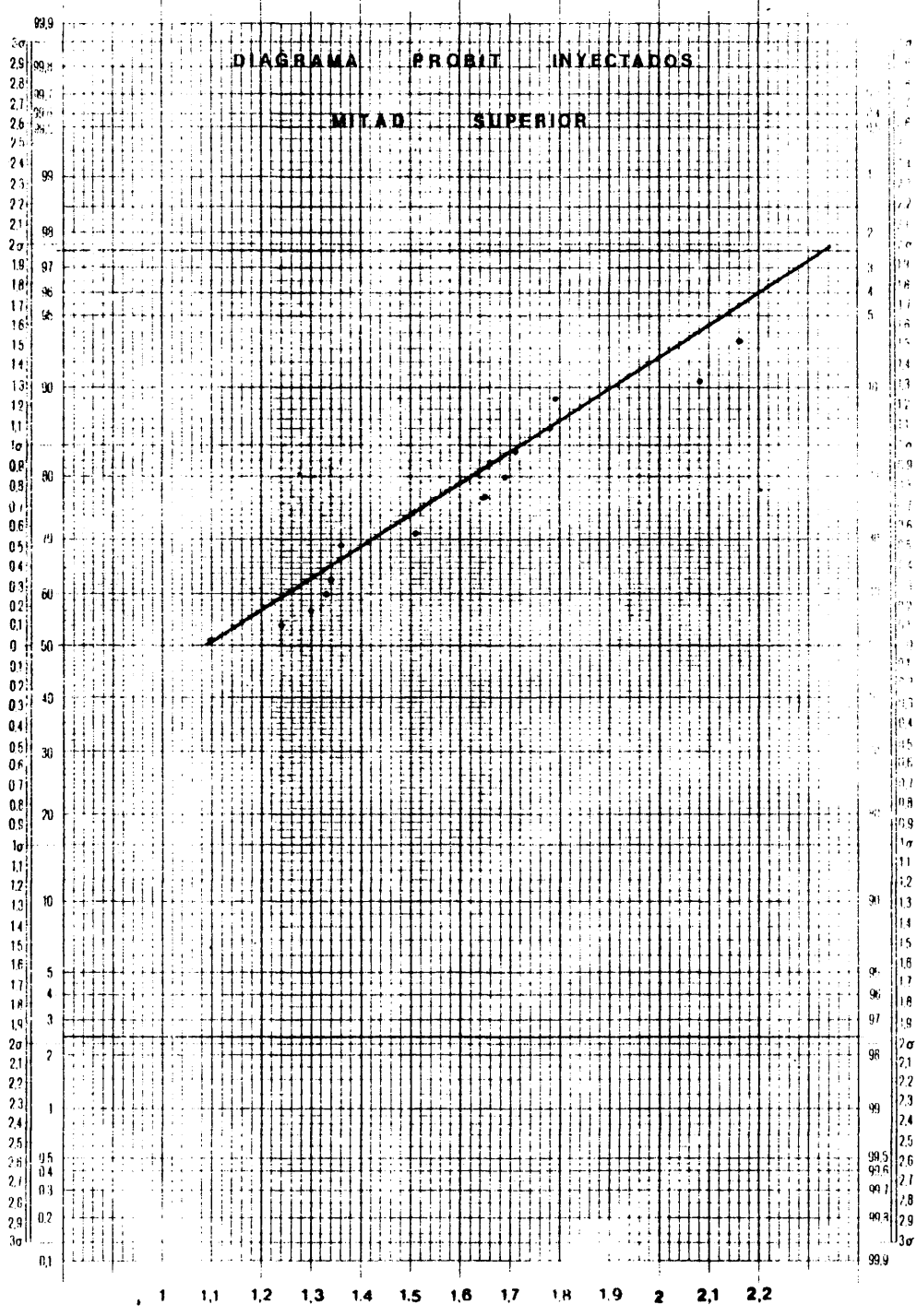
Ordenación y Frecuencias acumuladas:

0,30	0,89	1,24	0,54	1,65	0,77
0,43	0,99	1,30	0,57	1,69	0,80
0,56	1,01	1,30	0,57	1,71	0,83
0,57	1,03	1,33	0,60	1,78	0,86
0,72	1,04	1,34	0,63	1,79	0,89
0,72	1,04	1,36	0,69	2,08	0,91
0,75	1,07	1,51	0,71	2,29	0,94
0,82	1,10	0,51	1,65	0,77	2,61
0,96					2,87
					1,00

Ambos diagramas probit, muestran la linealidad de las muestras bivalentes de controles e inyectados y por tanto se puede aceptar la normalidad bivalente de las poblaciones que estudiamos.

El problema de la igualdad de ambas matrices de varianzas y covarianzas es aquí innecesario por ser los efectivos de las muestras iguales y relativamente elevados.





En estas condiciones la comparación tiene el rigor exigible.

El cálculo de la potencia del test, siendo $n_1 = n_2 = 35$,

$\alpha = 0,01$, $\gamma_1 = 2$ y $\gamma_2 = 67$, es prácticamente 100 %, así, si la diferencia entre $\hat{\mu}_1$ y $\hat{\mu}_2$ es real, entonces es seguro que el test, la pondrá de manifiesto.

Para comparar los vectores de medias utilizamos el test de -
HOTELLING, para el cual necesitamos la matriz:

$$A_1 + A_2 = \begin{bmatrix} 245,5538 & 114,9131 \\ 114,9131 & 370,0349 \end{bmatrix}$$

y las diferencias: $m_{11} - m_{21} = 0,9000$; $m_{12} - m_{22} = 11,6143$

entre \hat{m}_1 y \hat{m}_2 .

Para el cálculo de:

$$F = \frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 3)}{2(n_1 + n_2)} (\hat{m}_1 - \hat{m}_2)^T (A_1 + A_2)^{-1} (\hat{m}_1 - \hat{m}_2) \text{ con distribu}$$

ción $F_{67, 2}$ utilizamos el siguiente programa para una HP 25:

Test de Hotelling para comparacion de vectores de medias
en muestreo independiente.

1 STO 1	17 STO x 1	33 RCL 6
2 \rightleftarrows	18 STO x 1	34 RCL 5
3 STO 3	19 STO x 2	35 3
4 x	20 \downarrow	36 —
5 \rightleftarrows	21 STO x 3	37 x
6 STO 2	22 STO x 3	38 RCL 5
7 Gx^2	23 STO x 2	39 2
8 —	24 2	40 x
9 $gx = 0$	25 STO x 2	41 \div
10 GTO 16	26 \downarrow	42 RCL 1
11 STO 0	27 \downarrow	43 RCL 2
12 STO $\div 1$	28 STO 6	44 RCL 3
13 STO $\div 3$	29 STO 5	45 \div
14 CHS	30 \downarrow	46 +
15 STO $\div 2$	31 STO x 6	47 STO 7
16 R/S	32 STO + 5	48 x
		49 R/S

Pulsaciones a_{12}

ENTER

 a_{22}

ENTER

 a_{11}

f PROC.

R/S

(La inversa $(A_1 + A_2)^{-1}$

puede ser extraída —

ahora de los registros)

— . —

 n_1

ENTER

 n_2

ENTER

 $m_{11} - m_{21}$

ENTER

 $m_{12} - m_{22}$

GTO 17

R/S

En pantalla F

Registros $R_7 (\vec{m}_1 - \vec{m}_2)^T (A_1 + A_2)^{-1} (\vec{m}_1 - \vec{m}_2)$ $R_6 n_1 n_2$ $R_5 n_1 + n_2$ R_4 vacío

R_3	a_{11}
R_2	a_{12}
R_1	a_{22}

 $R_0 \det (A_1 + A_2)$ Obtenemos así el valor $F = 234,18$. El valor de la tabla —

F_{67}^6 a 1 % es 7,50, por tanto las poblaciones difieren muy significativamente.

Puesto que cada población contiene dos variables aleatorias, - "diámetro", "nº de gotas", corresponde ver ahora si ambos factores con tribuyen a la diferencia encontrada en el test o solamente uno de ellos.

Escogiendo el vector $\vec{a} = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \end{bmatrix}$ para el intervalo de confianza de la diferencia de medias "diámetros" $\mu_{11} - \mu_{21}$ tenemos:

$$0,90 - \sqrt{\frac{2}{35} \cdot 3,61} \quad \frac{2 \times 68}{67} \times 7,50 < \mu_{11} - \mu_{21} < \\ < 0,90 + \sqrt{\frac{2}{35} \cdot 3,61} \quad \frac{2 \times 68}{67} \times 7,50 \\ - 6,01 < \mu_{11} - \mu_{21} < 7,81$$

Este intervalo contiene el origen de coordenadas y por tanto, el factor "diámetro" no contribuye a la diferencia encontrada en el - test.

Para el factor "nº de gotas", partimos del vector $\vec{a} = \begin{bmatrix} 0 \\ 1 \end{bmatrix}$, obteniendo

$$11,6143 - \sqrt{\frac{2}{35} \times 5,44} \quad \frac{2 \times 68}{67} \times 7,50 < \mu_{12} - \mu_{22} < \\ < 11,6143 + \sqrt{\frac{2}{35} \times 5,44} \quad \frac{2 \times 68}{67} \times 7,50 \\ 3,1243 < \mu_{12} - \mu_{22} < 20,1043$$

Este intervalo no contiene el origen de coordenadas y por tan to el factor "nº de gotas" es el responsable de la diferencia.

De estos resultados estadísticos se puede deducir que:

La hidrocortisona no tiene efecto sobre el diámetro de los adipocitos.

La hidrocortisona actúa sobre el número de gotas, causando disminución del número de gotas dentro del adipocito, aumentando el volumen de dichas gotas.

198

COMENTARIOS

COMENTARIOS

Como decíamos en la introducción, la administración crónica de las hormonas Glucocorticoides, conduce a los animales a una hiperlipémia e hipercolesterinemia, y a las personas a una lipogénesis con incremento en la cantidad total de grasas, junto a una redistribución androide de la grasa orgánica. (Vague y Cols, 1973).

Esta acción lipogénica de los Glucocorticoides, ha sido — observada por numerosos autores, a través de:

— Aumento del peso del órgano y de su contenido, tanto hídrico — como lipídico. Así Fawcett y Jones (1949), Seyle y Timiras — (1949), Seifter y cols. (1951), Aronson y cols. (1954), Laohangce y Pagé (1953), Johansson (1959), Mazzucchelli y cols. (1961), — Fein (1965), junto con disminución proteica, Hahn y cols. (1969); — Rothbard (1958), lo estudió en el ratón gestante y finalmente Sims y cols. 1962, en el murciélago gestante entre otros.

— Aumento del tamaño del adipocito como expresó Orehota y cols. (1969).

— Aumento de las gotas lipídicas citoplásmicas, Sims y cols. 1962.

— Aumento de depósito de triglicéridos/gota por Fawcetty Jones — 1949.

De los cuatro parámetros elegidos por nosotros para la valoración del posible efecto de los Glucocorticoides sobre el TAP: Peso corporal, peso de TAP, diámetro de los adipocitos y número de gotas —

por adipocito; y de los cuales realizamos nuestro estudio estadístico, los tres primeros no muestran ninguna variación estadística entre el grupo inyectado y el grupo control. La única variación hallada es la lipidización de los adipocitos, que es mayor en los animales inyectados que en los controles. En los primeros aumenta el tamaño de las gotas de triglicéridos, mientras que disminuye su número, debido a que al aumentar el tamaño influyen varias de estas gotas en una sola, es decir, que hay un aumento del contenido graso de los adipocitos y en consecuencia aumenta el contenido graso del TAP.

La invariabilidad de los tres primeros parámetros contrasta fuertemente con los resultados obtenidos al emplear las mencionadas dosis tóxicas de Glucocorticoides, en corto periodo de tiempo. Así refiriéndonos a los dos trabajos al respecto mencionados en la introducción, podemos ver que Aronson y cols. (140), hallan:

- a) Disminución del crecimiento corporal: 21 grs. en los animales inyectados, sobre 27 gr. en los controles.
- b) Hipertrofia del TAP, que es del 200 a 300 % en los animales de 10 gr. de peso y del 25 % en los de 80 gr.
- c) Aumento del diámetro celular: 28 micras en los inyectados y 18 micras en los controles. No observan aumento en el número de células.
- d) Coalescencia de vacuolas hasta el extremo de comprimir y desplazar el núcleo a la periferia.

Los resultados de Hahn y cols. (143), son los siguientes:

- a) El peso corporal disminuye aproximadamente un 60 %
- b) El peso absoluto del TAP aumenta un 100 %, y como consecuencia de la disminución del peso corporal, el peso relativo del TAP es incrementado en un 260 %.
- c) El contenido graso del TAP aumenta en un 100 %, mientras que el contenido protéico disminuye un 30 %.

Podemos concluir, por tanto, diciendo que a las dosis — "farmacológicas" habituales, los Glucocorticoides producen en el TAP unas modificaciones mucho más discretas que las producidas a las dosis elevadas mencionadas, cuyas acciones podemos considerar, al menos en gran parte, de carácter tóxico.

Además de la diferencia en las dosis empleadas otro hecho distintivo en nuestra experiencia respecto a los otros autores, es el tiempo de realización de la misma. Así vemos como Skala y Hahn (91) — no solo administran la cortisona a dosis altas comparativamente a las nuestras, sino que además, lo hacen en inyección única y en dos tiempos distintos: A los 9 y los 30 días de la vida postnatal de la rata, encontrando resultados totalmente diferentes en ambas fechas.

En las ratas estudiadas a los 9 días, estos autores, describen alteraciones a nivel mitocondrial tanto de orden morfológico como funcional (disminución de la actividad de algunas enzimas como — de la Glucosa-6-fosfato y de la Succinodeshidrogenasa, así como disminución de la formación de CO_2), a la vez que aumenta la actividad citoplásmica y la lipogénesis, como demuestra el incremento de depósitos grasos, del diámetro del adipocito y del peso del TAP; alteracio-

nes que no encuentran nunca en el caso de que la administración de los esteroides y el estudio lo realizaban a los 30 días de vida de la rata.

Acciones similares de la Cortisona habían sido ya descritas por Kimberg (97 y 147); en mitocondrias del hígado de rata, que mostraban un incremento en el volumen, número y densidad mitocondrial, junto a cambios en la estructura de estos organelos.

Apoyados por estas experiencias previas y por sus propios hallazgos Skala y Hahn (91) interpretan que las mitocondrias del TAP se encuentran en período de formación hasta las inmediaciones del día 30 y, por lo tanto, son altamente sensibles a la acción de la cortisona, dejando de serlo en gran medida a partir de esta fecha, cuando alcanzan el estadio "maduro o adulto". Esta interpretación concuerda correctamente con las descripciones morfológicas de numerosos autores y también con el significado funcional y tiempo de función del TAP.

Desde el punto de vista morfológico, son muchos los autores que han encontrado un desarrollo progresivo mitocondrial y citológico en general, desde el nacimiento hasta el día 21 en el TAP de la rata; al llegar esta fecha las mitocondrias alcanzan su máxima expresión — morfológica, numérica y funcional para ir decayendo progresivamente — hasta estabilizarse.

E igualmente esta visión es acorde con la evolución biológica del TAP, dado que durante los 21 días primeros de vida el animal ha de pasar de la temperatura ambiente a la de neutralidad térmica — adulta y, por tanto, también el funcionamiento y morfología del TAP, — como órgano principalmente comprometido en esta función, sufre una evolución y estabilización progresivas. Así Porter y cols. (1978), con solo la variación de unos grados en la temperatura ambiental, demuestra que el TAP de ratas recién nacidas presentaba diferencias en la propor-

ción de agua, depósitos lipídicos, diámetro de adipocitos, peso del -
órgano e incluso peso corporal.

Dado que nuestra experiencia no alcanza más que al día 21 de la vida de la rata, no nos es posible valorar las diferencias de -
la acción hidrocortisona en el TAP antes y después de alcanzarse la temperatura de neutralidad, así como tampoco establecer el gradiente diferencial morfológico, histoquímico y funcional día a día a lo largo de los 21 días, ya que todas las ratas fueron sacrificadas en el -
día 21. Ahora bien, comparativamente con los autores citados, podemos decir que nosotros no hemos encontrado durante el período de máxi -
mo funcionamiento del adipocito pardo, que la hidrocortisona provoque variaciones en el peso corporal, ni alteraciones estructurales del -
adipocito como labilidad, daño mitocondrial, ni en valores absolutos ni en relación con los animales testigo. Una vez más, por tanto, pensamos que estos efectos se deben más a las elevadas dosis y pauta de administración del esteroide que al momento biológico del tejido.

Sin embargo, sí que hemos observado variaciones en el diámetro de las gotas lipídicas y patrones enzimáticos. De ello se desprende que para adentrarnos en las acciones fisiológicas y farmacológicas de los Glucocorticoides sobre el TAP, debemos valorar parámetros más finos y sutiles que los puramente morfológicos. De ahí el interés de la parte ultraestructural y sobre todo, el más decisivo del estudio -
histoquímico de nuestro trabajo.

COMENTARIOS ESTRUCTURALES Y ULTRAESTRUCTURALES

De las observaciones realizadas a microscopia electrónica el patrón característico de los adipocitos pardos concuerda con el descrito en la literatura por numerosos autores: (17,20,22,23,25,28,30, 31,32,38,62,75,149,150,151,152 y otros) por nosotros (ver tesis del autor (1978)).

Por esta razón no vamos a detenernos en este apartado sino - simplemente reseñar las diferencias observadas entre la población de ratas normales y las sometidas a tratamiento esteroideo, que se ponen de manifiesto en una serie de parámetros como son: La patente disminución de glucógeno en la población que denominamos "inyectada" respecto a la control, nos hablaría en favor de que el glucógeno de los - adipocitos pardos bajo la acción de los glucocorticoides, ha sido - transformado en glucosa para la obtención de ácidos grasos, es decir un aumento de la lipogénesis, hecho que se relaciona con la observación de un aumento de volumen de las gotas lipídicas, hecho confirmado por (Skala y Hahn 1970); aunque casi siempre se relaciona el tratamiento esteroideo con un aumento del peso del órgano y un mayor contenido lipídico y no de la célula en sí, por otra parte, nosotros no hemos - encontrado una diferencia en cuanto al peso del animal u órgano (ver resultados estadísticos) por tanto parece ser que esta lipogénesis aunque incrementada solo es puesta de manifiesto a nivel microscópico y - ultraestructural; siendo además por otra parte la vía lipogénica incrementada por la absorción de ácidos grasos al adipocito, a partir de - los triglicéridos de la circulación sanguínea por medio del enzima lipoproteínlipasa y su mediador heparínico (como comentaremos mas adelante en el capítulo de comentarios enzimáticos), implicaría un aumento global de la vía lipogénica, pero hemos de resaltar que por otra -

parte tambien está aumentada la via lipolítica, confirmado en la literatura por (Teodaru y Grishman 1961) y por nosotros con el aumento de la lipasa tisular, enzima hidrolítica activa en la via lipolítica por tanto parece ser que en estas condiciones el metabolismo del adipocito pardo, es muy activo, tanto en la via anabólica como catabólica aunque un poco desplazado hacia la derecha.

Tambien hemos de resaltar y en favor de lo expuesto anteriormente que la estructura mitocondrial está perfectamente conservada (fig.- 52), hecho que contrasta con lo expuesto por Kimberg(1963), que bajo la acción de los corticoides las mitocondrias aparecian degeneradas debido a los efectos tóxicos causados por la dosis de corticoides y que nosotros - evitamos desde el primer momento para que no se produjese dicho efecto secundario.

Por último reseñar la mayor abundancia de células de tipo mesenquimal que aparezcan bajo la acción de los glucocorticoides, que posiblemente sean indicativas de una gran actividad tisular, pero de función desconocida para nosotros.

COMENTARIOS HISTOQUIMICOS

Los partidarios de la acción lipogénica han descrito en primer lugar una disminución de los ácidos grasos oxidables y naturalmente de la oxidación de estos, hecho que corrobora la observación por parte de una gran parte de autores (Hahn y cols. (143), -- Kimberg y cols. (91); de una disminución de las deshidrogenasas mitocondriales, así como de los coencimas NAD y de los citocromos C y B. Igualmente los confirma la disminución del consumo de O_2 en ratas tratadas con cortisona (Orahota 1969, y Hahn y Cols. 1969) y la disminución en la formación de CO_2 descrita por Skala y Hahn 1970, -- mediante marcaje isotópico del ácido palmítico.

Nuestros hallazgos estadísticos se ven ampliamente confirmados por el estudio enzimático realizado al término del tratamiento esteroideo con cada una de las ratas de nuestras camadas. Podemos decir que las variaciones enzimáticas halladas sobre los controles -- nos llevan, en primer lugar, a pensar que los Glucocorticoides, a -- las dosis por nosotros empleadas y después de 17 días de tratamiento, tienen una ligera acción lipogénica con incremento de la captación de ácidos grasos, síntesis de glicerol y esterificación de tri glicéridos, pero paradójicamente también, y aunque en menor grado, -- está aumentada respecto al control la vía lipolítica, al mismo tiempo que la actividad mitocondrial del TAP se encuentra disminuida.

Esta panorámica general la deducimos del estudio de las -- siguientes enzimas:

1º.- Enzimas y Aminas comprometidas en la captación de ácidos grasos por el adipocito pardo desde la luz del capilar:
ACTIVIDAD PROTEIN LIPASA Y LIBERACION DE HEPARINA MASTOCITARIA.

Puesto que nosotros realizamos el estudio enzimático de manera topográfica en cortes, y no cuantitativamente en homogeneizados de tejido, y dado que la demostración de este enzima viene realizándose siempre en homogeneizados y plasma, en principio, nos era imposible practicarla. Así pues, uno de nuestros principales empeños desde el punto de vista técnico fué crear un método para la demostración -morfológica de este enzima, basándonos fundamentalmente en los trabajos originales de Korn (154) y Scow y cols. (155), como luego comentaremos mas ampliamente en el apartado de comentarios técnicos.

Pero dado que la sistematización de este método para la determinación directa de la Lipoprotein Lipasa podía ser larga y sujeta todavia a fallos y críticas interpretativas, empezados por observar indirectamente su actividad a través de un meticoloso estudio de la liberación de los gránulos de heparina desde los mastocitos en cortes de animales inyectados y de sus respectivos controles, ya que como es sabido la acción de la Lipoprotein Lipasa está mediatizada por la Heparina liberada desde los mastocitos por degranulación. Y - así vemos, que cuando se realizan estudios cuantitativos con estracto de tejido es preciso suplir esta amina mastocitaria con la administración directa de heparina al medio de cultivo; estando igualmente demostrada la inhibición enzimática por heparinasas bacterianas.

Debido a estos hechos nos pareció apropiado estudiar el nivel de degranulación mastocitaria mediante técnicas metacromáticas,

entre las que elegimos el Azul de Toluidina, en cortes semifinos seriados. De este estudio dedujimos que la depleción de granos mastocitarios era significativamente mayor en todos los casos con tratamiento de Glucocorticoides, que en los controles; siendo el número medio de granulaciones en los inyectados de 8/célula cebada (corte de célula cebada), frente a una media de 12 gránulos/por corte de mastocito en los controles; como puede verse en las figuras (23a y 23b).

Esta valoración óptica se confirmó ultraestructuralmente estudiando la depleción de granulaciones electrodensas mastocitarias — igualmente en animales inyectados y controles. En este estudio, además de realizar el conteo de los gránulos electrodensos, se valoró también la presencia de fusiones entre las membranas envolventes de los gránulos, o la creación de grandes vesículas, por repetidas fusiones, bien intracelulares o en comunicación con el medio extracelular; y por último, consideró igualmente la presencia de granulaciones electroclaras — en cualquiera de estas modalidades vesiculares o en el espacio extracelular perimastocitario.

Es decir, se tuvieron en cuenta todas las imágenes morfológicas observadas durante la degranulación mastocitaria, cuyos pasos — descritos por Börje Uvnäs, 1978 (156), son:

- 1º.- acercamiento de los gránulos;
- 2º.- fusión de sus membranas;
- 3º.- creación de una gran vacuola común de límites anfractuados;
- 4º.- liberación del contenido a esta gran vacuola,
- 5º.- fusión de la membrana vacuolar, con la membrana envolvente plasmática y por lo tanto comunicación con el medio extracelular, rico en Na,
- 6º.- pérdida de electrodensidad granular.

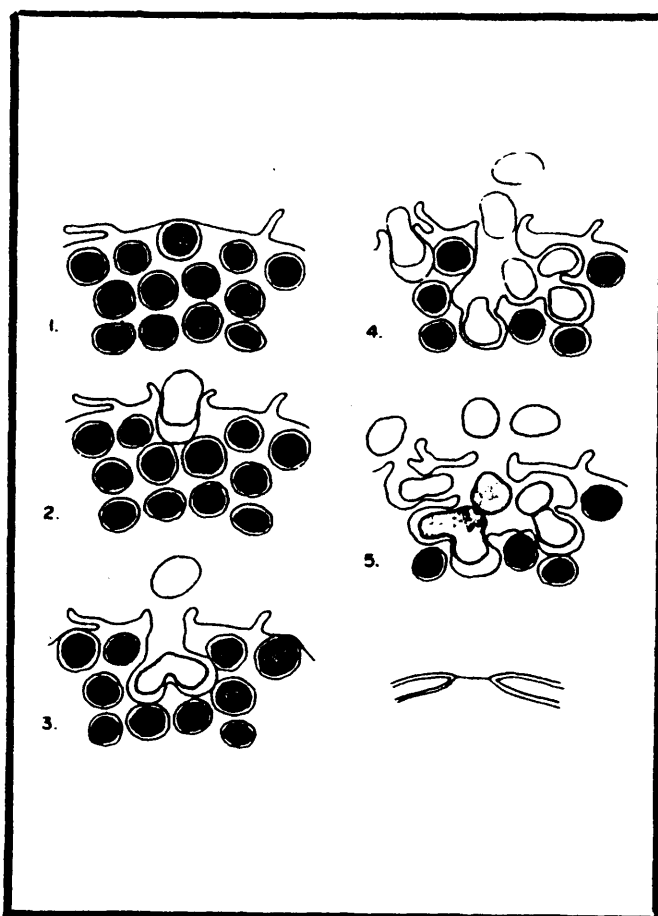
El mecanismo de exocitosis también puede ser individual, - como sucede más habitualmente en cualquier célula, por aproximación directa del gránulo a la membrana plasmática en primer lugar, 2ª fusión de las membranas vacuolar y plasmática y liberación directa del contenido al espacio extracelular en último término, mecanismo en el que también el gránulo se hace electroclaro en cuanto contacta con - el medio extracelular. (ver esquema XIII).

La pérdida de electrodensidad en todos los casos es debida como ha sido demostrado (156), a la competitividad existente entre la histamina y el sodio extracelular, de tal manera que en cuanto el complejo proteico-histamina presente en el gránulo, se pone en comunicación con el Na extracelular, este desplaza a histamina que es liberada, al mismo tiempo que el material se torna electroclaro.

Aunque el mecanismo químico de liberación de la heparina todavía no es tan conocido, lo que sí es seguro es que ocurre simultáneamente a la liberación de histamina y posiblemente, en opinión - de mayor parte de autores, tendría bases similares a las descritas - en la histamina. Por ello es interpretado que la presencia de gránulos electroclaros en el espacio extracelular o en las vacuolas enfractuosas son expresión de exocitosis tanto de histamina como de heparina.

En los cortes por nosotros estudiados pudimos apreciar en primer lugar la presencia de mastocitos altamente granulados en los - animales control frente a los más degranulados de los inyectados, confirmando así los contejes previamente realizados al microscopio óptico. Siendo además frecuentes las vesículas, mayores o menores, en comunicación con la membrana plasmática y los gránulos electroclaros, - en los mastocitos de ratas inyectadas comparativamente con los controles, como puede apreciarse en las figuras (40,41).

ESQUEMA XIII



Exocitosis de los granulos. Fusión inicial de la membrana celular y membrana perigranular. (B. Uvnäs. J. of Investigative Dermatology 71:76-80 1978)

De esta liberación de heparina puede, indirectamente, deducirse un incremento de la actividad Lipoprotein-Lipasa, y por tanto, en la captación de ácidos grasos desde el capilar al adipocito. Si a ello le unimos un aumento de Glucógeno, efecto primario de los G.C. tanto por vía glucogénica como neoglucogénica, descrito constantemente en la literatura (Fain, 142), Engel y Scott (96), Ashmore y cols. (157), y que nosotros también hemos podido observar de manera constante en los animales inyectados, tanto a óptico como a electrónico (fig. 40); podemos pensar que el adipocito pardo bajo la acción G.C., tiene aumentadas las fuentes, no solo de captación, sino también de producción de ácidos grasos, frente a la grasa parda del animal control.

ENZIMAS CITOPLASMICOS COMPROMETIDOS CON LA
LIPOGENESIS

El aumento de la enzima GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA, - bajo el tratamiento esteroide, ha sido descrito en la literatura previamente (97) y en nuestro trabajo se ve ampliamente confirmado como se puede apreciar en el cuadro (I) y Fig. (79a y b).

A nivel óptico, el enzima ocupa todo el citoplasma distribuyéndose en forma diseminada, confirmándose este hecho con M.E. (fig. 62 y 63), donde es evidente que se deposita fundamentalmente libre en el seno hialoplásmico, y en algunos casos con extraordinaria tendencia a rodear a las gotas lipídicas, en cinturón periférico perfectamente definido.

Los incrementos de este enzima bajo la acción del G.C. nos indican, como dice Diculescu (158), en su estudio en tejido adiposo — blanco, un aprovechamiento energético de la glucosa por vía licolítica anaerobia, o de Embden-Meyerhoff, hasta la obtención de Pirúvico, además de la obtención de Gliceraldehído 3 fosfato para la posterior síntesis de glicerol.

Si a ello le unimos el aumento en actividad enzimática de - Alfa-Glicerol-Kinasa y Alfa-Glicerol-fosfato-Deshidrogenasa, descritos por muchos otros autores (Mermann y Cols. (100) Ohkawa y Farber (159) y Skala y Hahn (91)) en la célula grasa bajo tratamiento esteroideo, podemos considerar también el incremento en la síntesis de Glicerol, a partir de la Glucosa o Glucógeno como sucede en el hígado merced a alfa - glicerol kinasa, o muy particularmente en el tejido adiposo por la alfa

glicerofosfato deshidrogenasa.

Todo ello nos confirma que la célula grasa parda, bajo la acción de la Hidrocortisona, tiene elevadas las dos fuentes necesarias para su función lipogénica: En primer lugar un aumento de la incorporación directa de los ácidos grasos a partir de los quilomicrones circulantes, y en segundo lugar la obtención citoplásmica de los dos substratos necesarios -ácidos grasos y glicerol- a partir de la glucosa o glucógeno.

Igualmente el incremento de todos los enzimas citoplásmicos citados, corrobora la hipótesis que Engel y Scott propusieron en 1951 y Wertheimer y Saphiro en 1948, intentando explicar la formación de triglicéridos en la célula grasa tras el tratamiento G.C., a través del glucógeno; razón por la que disminuye; lo cual implicaría una auténtica lipogénesis celular (Ingle (160), contrariamente a la opinión de aquellos autores como Engel y Scott (96), Teodoru y Grishman (148), que por encontrar paradójica la acción lipogénica del G.C., -vienen arguyendo que los lípidos depositados en el tejido graso provienen directamente del exterior y no a través de una auténtica producción metabólica celular.

ENZIMAS MITOCONDRIALES IMPLICADOS EN LA OXIDACION Y
PRODUCCION DE ACIDOS GRASOS

De todo este amplio capítulo enzimático, nosotros centramos la atención en cuatro actividades enzimáticas mitocondriales: Citocromo-oxidasa, Succinico-deshidrogenasa, Láctico-deshidrogenasa y Mállico deshidrogenasa.

LÁCTICO, SUCCÍNICO y MÁLICO DESHIDROGENASA: Fueron solamente valoradas a nivel óptico por lo que no pudimos precisar su localización exacta ni las diferencias topográficas de concentración. - La actividad de estas tres enzimas era intensa en los animales testigo, hecho que concuerda con los hallazgos de Fawcett (161), George y Eape (162), Ohkawa (159) y Oksanen (161) entre otros muchos - autores, y difiere de los descritos por Menschik (164) en el Cobaya (cuadros III, IV, V)

LA CITOCROMOXIDASA, mostraba una intensísima positividad en las ratas control. A microscopia óptica presentaba localización citoplásmica en depósitos de distribución irregular, que interpretamos más como difusión enzimática que como una auténtica actividad "in situ". Efectivamente, con el empleo de la técnica a microscopia electrónica, se pudo observar su localización mitocondrial, - fundamentalmente a nivel de las crestas, las cuales quedaban perfiladas con su característico polimorfismo (Fig. 69, 70).

En los cortes estudiados pertenecientes a ratas inyectadas, las tres deshidrogenasas citadas, tenían disminuida su actividad ligeramente, como puede observarse en el capítulo de resultados.

Consiguientemente, tanto los ácidos grasos como el ácido pirúvico procedentes del citoplasma aunque son degradados a nivel mitocondrial, siempre este aprovechamiento será inferior al realizado en el animal no tratado con Hidrocortisona, tal y como también observaron Hahn (143) - Kimberg, (97), Skala y cols. (91) y Drahota y cols (146). Y como indica la depleción de la Citocromooxidasa será también inferior al aprovechamiento energético, hecho que aún pone más en evidencia el estudio de la NAD-DIAFORASA que a continuación comentaremos.

NADH DIAFORASA Citoplásmica y mitocondrial. Mucho más expresivas fueron las diferencias en la actividad, entre animales testigo e inyectados, en el estudio de estas dos enzimas. En las ratas controles los depósitos demostrativos de actividad eran ya demostrativos a microscopia óptica (fig. 76, 81) y con microscopia electrónica (fig 66, 67) se podía observar la localización exclusivamente citoplásmica del primer enzima, aunque con marcada tendencia a situarse en torno a las mitocondrias y en la región que pudieramos denominar "perigota", mientras que la actividad del enzima mitocondrial, aunque objetivable en algunos momentos, era muchísimo más discreta (Skala y Hahn, 91)

En las ratas tratadas con Hidrocortisona, disminuía sensiblemente la actividad enzimática tanto de la variedad citoplásmica como de la mitocondrial, indicando una menor utilización del NADH y, por lo tanto, un menor rendimiento mitocondrial (fig. 67, 81) (Kimberg y cols. 97, 147).

Así pues, nuestros hallazgos enzimáticos encaminados a detectar la degradación mitocondrial de Acetil coenzima, procedente tanto del A. Pirúvico como de los ácidos grasos, así como su utilización energética, concuerdan -aunque con notables diferencias de grado -

o cuantitativas- con los de un gran número de autores como Aronson - (140), Skala y Hahn (91) etc., pero demostraron en grasa parda, blanca y otros órganos sometidos a tratamiento G.C., notables disminuciones en la actividad de las Deshidrogenasas mitocondriales, Coenzima NADH, Citocromos y consumo de Oxígeno.

Comparativamente con esta acción esteroide, tantas veces - enfatizada en la literatura, nuestros resultados no difieren mas que cuantitativamente, razón por la que, una vez más, podemos interpretar este hecho junto con Kimberg (97) y Aronson (140), como debido a la diferencia en las dosis empleadas por la mayor parte de los autores y nosotros, que en su caso por ser masiva y tóxica conllevaría - destrucción mitocondrial con anulación, si no total por lo menos parcial, de la función de estos organelos. Kimberg (97) expresa además que estos organelos por estar en periodo de formación en el animal - neonato pueden ser altamente alterados por el tratamiento Hidrocortisonico.

Pero salvo estas diferencias cuantitativas puede pensarse - que en todos los casos el adipocito pardo tiene sensiblemente disminuida la capacidad oxidativa y de producción energética (química y - calórica), tras el tratamiento esteroide, siendo que, por otro lado recibe un mayor aporte de ácidos grasos, glucógeno y glicarol, es - obvio que en su mayor parte estos principios quedarán, tras su esterificación, almacenados como triglicéridos, hechos que tambien Hahn (91) corroboran nuestros hallazgos morfológicos y estadísticos.

ENZIMAS LIPOLITICAS, ESTERASAS Y LIPASAS CITOPLASMICAS -

Debido a la paradójica existente en la literatura sobre la acción predominante lipolítica y/o lipogénica de los G.C. en el tejido adiposo (Lipolítica: Itaya (84), Teodoro Grishman (148) Engel y Scott - (96), Khoo y cols (87), Steiner y Cahill (165); Lipogénica: Fawcett -

(161), Aronson (140) Lachance y Pagé (93), nuestra investigación también se encaminó a la demostración de enzimas citoplásmicas comprometidas en el catabolismo graso, algunas de carácter no específico como las L-ESTERASAS y las B-ESTERASAS, capaces de hidrolizar ésteres de cadena corta (C-2 a C-4) de ácidos alifáticos y glicerol, y otras de las llamadas específicas del tipo de las ALI-ESTERASAS COMO LA LIPASA TISULAR, capaz de hidrolizar ésteres de ácidos grasos de cadena larga (C-8 a C-18).

Dado que según las técnicas tradicionales, a veces, se hace - muy dificultoso separar estos dos tipos de actividad Lipasa/Esterasa, incluso tras el empleo de inhibidores, gran parte de nuestro interés se ha centrado en el perfeccionamiento técnico para poder utilizar - selectivamente un inhibidor correcto, que además tuviera en cuenta la especificidad de la lipasa en el TAP de la rata. Empresa que ya comenzamos en los "albores" de este trabajo (ver tesis del autor (153), y que hemos continuado en la actualidad, como posteriormente comentaremos.

En los animales controles los enzimas lipolíticos (Esterasas inespecíficas y Lipasas) fueron muy positivos de marcada localización citoplásmica. A microscopia electrónica pudo observarse (fig. 73, 74) su casi exclusiva tendencia a depositarse en torno a las gotas triglicéricas que realmente se hallaban encinturadas por los gránulos electrodensos del contraste enzimático.

Contrariamente a los resultados de la mayor parte de los - autores (mismos que acción lipogénica) que en su material, tras el - tratamiento G.C., han descrito una deplección de la actividad Lipasa tisular, en nuestros casos las Esterasas o bien no muestran variación sobre los testigos o están discretamente aumentadas, como puede observarse en el cuadro (IX y X) de los resultados, hecho que también con-

trasta con la opinión de Hahn (101) de que la actividad Lipasa Tisular es inversamente proporcional a la de la Lipo-Protein Lipasa, - más bien, como dice Khoo (187), sus acciones serían totalmente independientes.

Ello nos lleva a considerar que los G.C., a las dosis por nosotros empleadas, tienen también una acción lipolítica en el TAP, aunque de intensidad muy débil, siempre inferior a la acción lipogénica. Como es obvio, este hecho aún aumentará más la cantidad de ácidos grasos disponibles por el adipocito pardo, y siendo que su capacidad de oxidación y conversión energética están disminuidas, - forzosamente volverá a esterificar estos ácidos grasos o más comúnmente, los exocitará al capilar.

Cabe pensar también, que esta misma abundancia de ácidos grasos, sea uno de los mecanismos bloqueantes de la acción mitocondrial como expresan Kimberg y Cols. (147) y Prussine y cols. (71), - que aunque no ha sido el objetivo de nuestro trabajo podría ser una puerta abierta para el conocimiento del mecanismo de acción G.C. en los caminos íntimos de inhibición de la función mitocondrial del TAP.

Nuestro hallazgos nos llevan a pensar que los G.C. a dosis "farmacológicas" activarían dos de las funciones habituales del adipocito pardo. En primer lugar y en mayor grado la acción lipogénica, - mientras que disminuiría la función específica del TAP, el aprovechamiento energético (en este caso calorífico) de los ácidos grasos. Dicho de otra forma, pensamos que los G.C. viran la función específica del TAP acercando el funcionamiento de este órgano al del TAB, es decir, que al igual que la célula grasa blanca el adipocito pardo pasaría a tener una acción predominantemente "almacenadora y reguladora" de la energía, esterificando aquellos ácidos grasos libres no reque-

ridos por el organismo y liberándolos de nuevo a la circulación de acuerdo con las necesidades orgánicas o estímulos y controles hormonales del momento.

Aunando todos los parámetros que hemos utilizado en nuestro estudio: Peso del TAP, diámetro de los adipocitos, su número y tamaño así como el de las gotas lipídicas, y los estudios morfológicos y enzimáticos, tanto a nivel óptico como ultraestructural, podemos concluir diciendo que los Glucocorticoides concretamente la Hidrocortisona, utilizada a dosis farmacológicas del día 5 al 21 de vida, tienen una acción fundamentalmente lipogénica, si bien esta acción no es tan excesiva como se ha pretendido, y se ve también parcialmente compensada por una, menor, acción lipogénica.

La acción LIPOGENICA queda confirmada en nuestro trabajo por un aumento en el volumen de las gotas, así como por una mayor captación de ácidos grasos y de síntesis citoplásmica de los mismos y glicerol, que hemos podido demostrar por la elevación de la actividad de la Lipoproteínlipasa y su activador Heparina mastocitaria, aumento de G-6-PDH, Alfa-Glicerokinasa, así como de los depósitos de Glucógeno. Si bien esta lipogénesis no tan intensa como para producir aumento del peso del TAP, aumento del peso del animal, ó del diámetro de los adipocitos, como también han demostrado otros autores.

Su ligera acción LIPOLITICA, se ve confirmada por la actividad Esterasa mantenida y sobre todo Lipasa Tisular, y precisamente por todos los resultados "negativos" que acabamos de señalar (no aumento de peso del órgano, ni corporal... etc.), los cuales quedarían parcialmente neutralizados tanto por la débil acción lipolítica del G.C. como por la exocitosis de los ácidos grasos.

Por último es de señalar que tanto a nivel morfológico como enzimático la actividad mitocondrial está preservada, si bien disminuida por la acción de los G.C. En ningún caso hemos encontrado las alteraciones morfológicas provocadas por otros autores y referidas - por Kimberg (97) y Hausberger (53), como: Electroclaridad mitocondrial, fenómenos de hinchamiento, alteraciones y destrucciones de las crestas, etc. Los enzimas mitocondriales como las deshidrogenasas estudiadas, aunque también disminuyen su actividad, la depleción no es tan significativa como para anular la función mitocondrial notable y drásticamente.

Por ello, y como ya aludíamos en la introducción, podemos — concluir diciendo que la mayor parte de los efectos descritos por los G.C. en el TAP y en el tejido graso en general, son producto de una — destrucción por toxicidad de las estructuras celulares, fundamentalmente debida a una alta dosificación de los esteroides; mientras que a — dosis "farmacológicas" la acción fundamental, a nuestro entender, sería un "cambio" en la biología del adipocito pardo que inhibiendo su función específica de producción energética, exacerbaría sus funciones de regulación y almacenaje energético, acercándose más al adipocito — blanco.

ESTUDIO COMPARATIVO DEL TAP y TAB y OTROS TEJIDOS
CIRCUNDANTES BAJO LA ACCION DE LA
CORTISONA.

El estudio comparativo morfológico e histoquímico entre TAP y TAP, fué el principal objetivo de nuestra Tesina, al mismo tiempo - que comparábamos también algunos de los datos obtenidos en estos tejidos con el tejido muscular y endotelial de capilares circundantes. Como entonces expresamos, y como es opinión de la casi totalidad de los autores (Lindberg (38), Smith y cols. (43). etc.), las diferencias enzimáticas halladas entre los dos órganos grasos eran más cuantitativas que cualitativas (ver Tesina del autor (153).

En la presente Tesis, hemos tratado de completar este trabajo haciendo una medición enzimática y confrontamiento morfológico de ambos tejidos con y sin tratamiento con Hidrocortisona, tal y como se puede observar en los cuadros correspondientes del capítulo de resultados. E igualmente hemos estudiado la actividad de las tres esterasas no comprometidas directamente con la función del tejido graso, - como son: FOSFATASA ALCALINA, FOSFATASA ACIDA y ADENOSIN-TRIFOSFATASA.

Respecto a la acción comparativa de los Glucocorticoides en el TAP y otros tejidos, puede observarse en nuestros resultados que, - por lo general, se encuentran los mismos aumentos y disminuciones en la actividad enzimática con el Tejido adiposo blanco y tejido muscular, pero con algunas peculiaridades que comentaremos a continuación.

La actividad de la Succínico y Láctico Deshidrogenasas mues-

tra una notable diferencia entre el tejido blanco y los tejidos par- do y muscular, estando en el primero, ya con normalidad, más bajo en actividad que en los otros dos tejidos; hecho que no es de extrañar toda vez que tanto el tejido muscular como el TAP necesitan de una - alta oxidación de ácidos grasos y acetil-Co A, función que el TAB no realiza en este extremo. En presencia de la Hidrocortisona, si bien disminuye esta actividad en todas las variantes de tejidos, en el - TAB llega casi a anularse o por lo menos queda reducida a un nivel - basal o de mantenimiento.

Aquellos enzimas que como la Citocromooxidasa, son habitual- mente más abundantes en el TAP, mantienen también esas diferencias - tras el tratamiento G.C., y así aunque está en todos los tejidos di- minuida, el grado de depleción es mayor en el TAB y en el músculo, - reiterándonos que el tejido mantiene sus peculiaridades y caracterís- ticas funcionales aún en el caso de que halla una sensible pérdida - de las mismas.

Frente a ellos es de señalar que las Esterasas Inespecíficas y la Lipasa tras el tratamiento con Hidrocortisona se encuentran au- mentadas y aún más en el TAB que en el TAP, señalando que el efecto - lipolítico de estas hormonas es superior en aquel tejido.

Así pues, como ya ha sido con anterioridad confirmado en la bibliografía por Faín (112), Thompson y cols. (104), la acción de - los G.C. es en principio superponible para el TAB, TAP y tejido mus- cular, pero mientras que su acción lipolítica se manifiesta más en - la célula adiposa blanca, en la parda es algo más manifiesta su ac- ción lipogénica, mientras que en ambas disminuye la producción ener- gética.

La actividad de las Fosfatasa antes citadas fué particular-

mente intensa a nivel capilar, demostrando que tanto lisosómicamente como en mecanismos de transporte son más activas las células endoteliales que cualquier tipo de adipocito o miocito.

No obstante es preciso señalar que mientras que la Fosfatasa Alcalina es particularmente baja en el parénquima de TAP, la Fosfatasa Ácida tiene mayor actividad que ningún otro de los tejidos estudiados, posiblemente ello se deba también al tiempo en que se ha realizado la experiencia, toda vez que en el periodo de nacimiento y concretamente en los días perinatales el TAP de la rata aumenta considerablemente su riqueza lisosomal, como ya describieron — Hahn y Cols. (166), principalmente por la creación de citolisosomas encaminados a la digestión de los catabolitos y restos degradativos celulares producidos por la alta actividad metabólica a que se ven sometidas las células grasas en este periodo.

CRITICAS Y COMENTARIOS DE LAS TECNICAS EMPLEADAS:
PROTEIN LIPASA PARA INCLUBACION DE CORTES HISTOLO-
GICOS Y MODIFICACION EN LA LIPASA TISULAR Y ESTE-
RASAS INESPECIFICAS.

1) Modificaciones en Esterasas y Lipasas

Dado que con las técnicas tradicionalmente descritas para Esterasa Inespecíficas (L-Esterasas y B-Esterasas) y Lipasa Tisular, a veces se hace muy difícil separar estos dos tipos de actividad, incluso tras el empleo de inhibidores, hemos dedicado una parte de nuestra actividad a comprobar aquel inhibidor que pudiéramos considerar idóneo, teniendo en cuenta la especificidad de la Lipasa para el tejido graso pardo.

Ya Gomori en 1945, señaló que la topografía de la acción enzimática utilizando el método Tween, no es igual a la descrita — por Nachlas y Seligman para las Esterasas (1949). Ciertas células — de la porción del cardíaco del ratón, son intensamente Tween positivas, pero esterasa negativas, esto se interpretó como debido a que las Lipasas verdaderas podían hidrolizar los esteres de ácidos grasos rápidamente, propiedad que no poseían las Esterasas no específicas. Esta diferencia está reforzada por las distintas respuestas a pequeñas concentraciones de Taurocolato Sódico, que también puede servir para distinguir los dos tipos de enzimas.

Fue también Gomori (1952), el que se percató de que el tratamiento con Fenol al 5% durante 1 minuto, destruye el enzima,

y señaló igualmente las diferencias de ambos tipos de enzimas pancreáticas con adición de taurocolatos.

El mecanismo de acción consiste en que en presencia de estas res solubles en agua, como son los de cadena larga de ácidos grasos saturados con poliglicol o polimanitol (Tween) y de iones calcio, se produce la hidrólisis liberándose ácidos grasos insolubles en agua, junto a jabones cálcicos, los cuales se depositan "in situ" y que por la acción posterior del Nitrato de Plomo, pasan a jabones de plomo, para ser más tarde visualizados mediante el contraste con Sulfuro de Amonio. Los lugares de actividad se muestran como precipitados de color marrón oscuro.

Quizá uno de los mayores problemas para separar ambas actividades esté en la elección del Tween. Existen en el mercado diferentes Tween: 20, 40, 60, 80 y 85. La modalidad Tween 60, fué utilizada por Buño y Marino en técnica de Gomori, como sustrato de la Lipasa y fueron incapaces de diferenciar la actividad de esta de las Esterasas no específicas. Pero fué Siurela quien en 1956 hizo un estudio más completo, utilizando las variantes T. 20, 40, 60 y 80, en su estudio sobre Lipasa de mucosa gástrica de hombre y mono, sin llegar a distinguir las Lipasas de las E. no específicas.

En nuestra experiencia, después de realizar la técnica en tejido adiposo blanco y pardo, con todas las variantes de Tween, la que mayor especificidad ofrece para la Lipasa verdadera es el T. 85, tal y como se puede apreciar en las fig. 86a y b).

A demás de las variantes en inhibidores y Tween también realizamos un estudio de pH óptimo para la actividad lipasa, realizándolo a pH entre 6 y 8; y por último valorando distintos tiempos de incubación entre 1 y 12 horas. Los mejores resultados los obtuvimos a

pH 7,2 en un tiempo de incubación de tres horas, contrastando posteriormente con nitrato de plomo al 1,5 %.

Por último hemos efectuado la comprobación de la actividad de la lipasa a microscopía electrónica, según la técnica de Nagata y Murata (1972) con las variantes descritas, comprobando que la actividad citoplásmica objetivada a microscopía óptica tiene una localización preferente en retículo endoplásmico liso y en torno a las gotas lipídicas, como se puede apreciar en las figs. 73 y 74).

De todo lo expuesto, podemos concluir que los mejores resultados en la técnica para demostración de la actividad Lipasa tisular y diferenciación de la actividad Esterasa no específica, se obtiene con la siguiente combinación: Tween 85, pH 7,2, incubación de 3 horas a 37°C y contraste con Nitrato de plomo al 1,5 %, siguiendo los protocolos generales del método óptico y electrónico de Nagata y Murata (1970) Pearce (1971).

II) Determinación morfológica en cortes histológicos de la actividad Protein Lipasa o Factor de Aclaramiento plasmática.

Como ya dijimos anteriormente uno de nuestros principales objetivos técnicos, ha sido el poder conseguir la determinación histológica del enzima lipoproteinlipasa en cortes histológicos, toda vez que únicamente se realiza cuantitativamente en homogeneizado de tejido y plasma. Pero nuestros sucesivos intentos todavía no han tenido el éxito esperado, debido a la gran cantidad de dificultades que se nos han presentado, sobre todo en orden a la demostración del producto (ácido graso) obtenido después de la incubación. Y dado que perseguir su determinación pudiera hacerse "eterno" o "inalcanzable para nosotros", hemos decidido escribir esta Tesis, y continuar después en

el empeño. No obstante nos ha parecido que podría ser interesante el comentar algunos de los datos de mayor relieve encontrados, tanto a nivel de los hallazgos como de las dificultades.

En principio seguimos la misma sistemática general descrita por Korn (154) para su estudio en homogeneizado de tejido, pero - naturalmente variando aquellos aspectos que fueran peculiares en este tratamiento y sustituyéndolos por los apropiados para la incubación en corte de tejido.

Trés la extirpación de la grasa parda esta se congeló inmediatamente con Pentano/carbónico, y posteriormente se obtuvieron los cortes en criostato Ames a -30°C .

Dado que la gran cantidad de grasas esterificadas y ácidos grasos presentes en el tejido podrían enmascarar los resultados, comenzamos por pasar previamente los cortes por Acetona y Eter, consiguiendo de esta manera el doble objetivo de eliminación de las grasas y de fijación del tejido. Para preservar el enzima y su difusión este "lavado-fijación" se realizó a -30°C . Con objeto de valorar el tiempo y el medio de lavado óptimo, se hicieron con dos tiempos de eliminación. Uno con Acetona y otro con Acetona/Eter, manteniendo un tercer grupo sin aclarar; además de utilizar ambos medios se variaron los tiempos, de tal forma que un grupo de cortes se mantuvo en el aclarante graso durante 24 horas, otro 12, otro 6 y otro solamente 2, observándose una buena disolución y barrido lipídico ya en breve tiempo de 2 horas y óptima a las 6 horas; no superada por aquellos cortes mantenidos más tiempo. La eliminación era mejor utilizando Acetona/Eter.

El sustrato elegido naturalmente, eran Lípidos formados por ácidos grasos, preferentemente de la variedad insaturada por dos.

razones: En primer lugar, por ser este tipo de sustrato de más alta especificidad para el enzima lipoproteínlipasa que la variante saturada, y en segundo lugar porque pensamos que contábamos con técnicas más específicas para su demostración posterior, capaces de romper o bloquear los dobles enlaces. No obstante también se usaron triglicéridos con ácidos grasos totales saturados y no saturados, tanto en forma de sustratos comerciales como de quilomicrones obtenidos directamente de la rata. En estos casos, el producto obtenido tras la incubación se realizó detectando los grupos carboxílicos.

Puesto que el enzima lipoproteínlipasa actúa siempre sobre los lípidos de los quilomicrones que contienen una fracción protéica apoproteína C-II (apo C-II) que activa la lipoproteín lipasa formando un complejo estable. Es preciso ofrecer el sustrato unido a proteínas plasmáticas, bien porque estaban unidos naturalmente o por adición al medio de cultivo; y naturalmente en todos los casos se hicieron paralelamente cortes testigos incubados sin sustrato.

Estas cinco variantes eran:

- a) Sustrato comercial de lípidos de ácidos grasos insaturados, con adición de Albúmina y Plasma, este último libre de Carbonatos y Fosfatos por ser habitualmente inhibidores del enzima.
- b) Sustrato lípido de ácidos grasos totales (saturados e insaturados) con adición de Albúmina y Plasma en igualdad de condiciones que en el caso anterior.
- c) Utilización directa del VLDL humana.
- d) VLDL de rata, obtenida directamente por centrifuga-

ción sanguínea.

- e) Y por último, ofreciendo quilomicrones de rata, obtenidos de la sangre de la rata tras el sacrificio inmediato a la hora y media de la ingesta. En este caso se adicionó siempre plasma.

De todas estas variantes de sustrato, fué con las dos últimas con las que se obtuvieron los mejores resultados.

Como hemos venido comentando amplia y frecuentemente, esta acción enzimática se realiza bajo la estimulación de la Heparina liberada desde los mastocitos cercanos del tejido, por ello, en todos los casos nosotros añadimos esta sustancia al medio de incubación. Y para valorar su capacidad de activación enzimática, se realizaron preparaciones control en las cuales se suprimió dicha heparina, observándose que en estos casos la actividad o era nula o sensiblemente inferior, no distinguible generalmente de los testigos incubados sin sustrato.

El pH óptimo señalado en la literatura para este tipo de actividad enzimática (en homogeneizado) es altamente alcalino, generalmente de 8,1; aunque algunos autores la realizan a pH más ácidos. Nosotros tras estudiar los resultados a variantes de pH 5, 7 y 8, - confirmamos que es este último el óptimo y por ello, la mayor parte de nuestras preparaciones se realizaron a este pH.

Por último, partiendo de que los iones NH_4 son activadores ordinarios de la LPL, elegidos como tampón el Tris-maleato con adición de sales de NH_4 .

De todo lo expuesto podemos resumir diciendo que el medio de incubación se realizó como sigue:

- 1.- Buffer Tris Maleato, con sales de NH_4 , a pH 8,1
- 2.- Heparina, Sal sódica (20 Unidades/cc.)
- 3.- Albúmina bovina al 15 %, fracción V Armour con sales de Plasma a doble concentración de la normal, pero sin iones fosfato o bicarbonato.
- 4.- Substrato de lípidos totales o insaturados, según los casos, a una concentración de 50 mgr/cc. O en su lugar Quilomicrones obtenidos de la sangre de la rata.
- 5.- Las dos últimas fracciones (3 y 4) eran eliminadas cuando se utilizaba como substrato VLDL de rata o humana. En este caso el substrato de VLDL se obtenía por centrifugación sanguínea y se usaba en fresco y en cantidad que substituyese a las fracciones 3 y 4.

En este medio de incubación se mantuvieron los cortes durante hora y media o dos horas, ya que hasta este tiempo la actividad enzimática tiene un crecimiento lineal, decayendo a partir de las dos horas. La temperatura de incubación fué de 37°C.

Quizá el capítulo que nos ofreció mayor dificultad fué la demostración de los ácidos grasos captados por la célula tras la hidrólisis y acción enzimática. Esta dificultad emana del hecho de que no hay técnica idónea para su demostración.

Un grupo de técnicas como el ACIDO OSMICO y la REACCION de SCHIFF previo tratamiento ácido con PERACETICO o PERFORMICO, - (131), son descritas en la literatura como capaces de teñir los ácidos grasos insaturados, la primera por que el tetraóxido de osmio es capaz de romper y luego oxidar los dobles enlaces del ácido graso, polimerizando, a través de los cuatro oxígenos del tetraóxido de osmio, cuatro ácidos grasos; la segunda porque el tratamiento ácido rompe también estos dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados liberando grupos aldehídos que reaccionan después con el reactivo de Schiff, a la vez que viran la leucofuccina a color rojo. La dificultad estriba en que estas técnicas son capaces de detectar cualquier otro ácido graso insaturado existente en el tejido, además de cualquier otra sustancia con dobles enlaces, por lo que al carecer de especificidad, es a veces imposible el eliminar las falsas positividades aún trabajando con bloqueantes para las demás sustancias, eliminado por lavados en acetona/éter los ácidos grasos preexistentes en el tejido y aunque, naturalmente, la valoración se haga sobre controles no incubados en substrato.

Otro grupo de técnicas como la FISCHLER (131) o la simple adición de NITRATO DE PLOMO al 2%, tiene como principio la detección de los grupos carboxílicos del ácido graso. En el primer caso mediante la incubación prolongada a 37°C, en Acetato cuprico a saturación, el Cu reacciona con los grupos carboxílicos prestándoles una tonalidad azul brillante, y en el segundo caso es el plomo el que reacciona en saponificación con el grupo carboxílico tiñéndolo de negro o pardo oscuro con el sulfuro de amonio. Pero una vez más estas reacciones distan mucho de ser específicas para los ácidos grasos toda vez que pueden detectarse también los grupos ácidos protéicos o en general cualquier grupo carboxílico del tejido.

Este "adolecer" de un medio preciso para Ácidos grasos y Lípidos enmascarados ha sido y es lamentado constantemente por todos los autores (Barka (132), Pearse (133), Mc Manus (131...ect), y una vez más es la causa de que en nuestro caso no podamos excluir - los falsos positivos y, por tanto, llegar a una medición exacta de la actividad enzimática de la Lipoproteinlipasa.

No obstante, aun partiendo de la adición de otros ácidos grasos en nuestros resultados, si que hemos podido detectar parcialmente esta actividad LPL como puede observarse en las fig. 92 y 93 - así como valorar y criticar muchos aspectos técnicos de método empleado y finalmente hallar diferencias de actividad LPL en el tejido adiposo pardo con y sin tratamiento esteroideo, resultados todos ellos - que señalaremos brevemente a continuación, y que si no nos hemos atrevido a que figuren dentro de nuestros resultados y comentarios generales de la Tesis es en espera de conseguir en breve una técnica específica para la demostración del producto enzimático ácido graso, que excluyendo los falsos positivos acredite totalmente nuestros resultados.

De todo ello, los resultados que podemos destacar brevemente son los siguientes:

- a) Es preciso para poder eliminar enmascaramientos de la actividad, la eliminación de los lípidos existentes en el tejido con el paso previo de este por solventes lipídicos, de ellos el de elección sería el de Acetona/Eter, con un tiempo entre 2 y 6 horas (Fig. 94).
- b) El sustrato de elección es el VLDL o quilomicrones del propio animal, en nuestro caso de rata, y en su defecto los quilomicrones obtenidos de la sangre del animal. En ambos casos

los resultados son superiores a los obtenidos con el empleo de triglicéridos y lípidos comerciales. (fig. 92 a 97).

- c) Es precisa la adición de Proteínas y sales plasmáticas, si estas no van naturalmente unidas al sustrato.
- d) Igualmente si se quieren conseguir una correcta actividad LPL, es necesaria la adición de Heparina al medio de cultivo, ya que sin ella no existe actividad detectable (Fig. 98 y 99).
- e) El pH óptimo es de 8 a 8'1; y aunque puede conseguirse con la utilización de otros tampones, ofrece resultados excelentes al Tris-maleato.
- f) Son activadores los iones de NH_4 e inhibidores de la actividad los fosfato y/o bicarbonato.
- g) La temperatura óptima es la corporal de 37°C ., y el tiempo de incubación de hora y media a dos horas.
- h) En nuestra experiencia en ningún caso pudieron eliminarse falsas positividades con el empleo de las técnicas para la demostración del producto de actividad enzimática el ácido graso, de tal forma que con todas ellas podría observarse una tonalidad de fondo (roja con el reactivo de Schiff, azul con las técnicas cuantitativas. etc.) pero sobre ellas podían detectarse puntos más intensamente positivos que detectaban la actividad enzimática. En nuestra opinión, los mejores resultados se obtienen con la utilización del reactivo de Schiff tras el tratamiento con ácido peracético.

- 1) La actividad, aunque "in vivo" se realiza a nivel capilar, es decir que el enzima se desplaza desde la membrana del adipocito hasta la luz capilar, donde, bajo la activación heparínica es capaz de hidrolizar el complejo Triglicerido-proteína, en nuestros casos en que el sustrato se ofrece directamente a la célula la actividad se detecta en citoplasma y membrana. Por otro lado dado que su determinación no se realizó a microscopia electrónica, no se pudo establecer la más o menos estrecha conexión con la membrana, ni tampoco si pudiera tener relación con otros organelos celulares, hecho que pensamos llevarlo a la práctica con posterioridad.

C O N C L U S I O N E S

CONCLUSIONES

El objetivo del presente estudio, ha sido comprobar qué alteraciones se producen en el tejido adiposo pardo de la rata en el periodo postnatal, como consecuencia de la administración de una dosis moderadamente alta de Hidrocortisona (5 mg/Kg/día), durante un tiempo prolongado (días 5 al 21 de la vida postnatal).

De todos los métodos de valoración empleados podemos extraer las siguientes conclusiones:

1ª.- De nuestra valoración estadística aplicada a los parámetros: Peso corporal y peso del órgano graso interescapular, concluimos que: Las poblaciones de animales controles e inyectados, a los 21 días, tiene un peso corporal y un peso del TAP equivalentes. Observándose además una fuerte correlación entre estos dos parámetros tanto en la población control como en la población inyectada.

Los coeficientes de correlación poblacionales, entre controles e inyectados, son equivalentes y la introducción de estas correlaciones en un test bivalente no pone de manifiesto la existencia de diferencias; siendo además la probabilidad de que no hallamos puesto de manifiesto una diferencia, que realmente exista, muy pequeña ($\beta = 5\%$) mientras que la probabilidad de haberla descubierto es ($1-\beta = 95\%$). Debemos aceptar por tanto la equivalencia de ambas poblaciones tanto en el peso corporal como en el peso del TAP.

2ª.- Con idéntico método estadístico hemos confirmado que la —
 hidrocortisona no tiene efecto sobre el diámetro de los —
 adipocitos pardos, mientras que sí actúa sobre el número —
 y diámetro de las gotas intracitoplásmicas de triglicéridos, causando —
 disminución del número de las mismas y aumentando su diámetro como con —
 secuencia de la fusión entre ellas.

3ª.- El enzima citoplásmico Glucosa-6-Fosfato-Deshidrogenasa,
 comprometido en el aprovechamiento de la glucosa, se ha —
 lla incrementado, pero simultáneamente hemos encontrado —
 una disminución de la actividad NADH-Diaforasa citoplásmica, imbricada
 en el aprovechamiento energético de este principio. Si a ello le suma-
 mos el incremento en actividad alfa-Glicerol-Fosfato hallada por otros
 autores, (responsable de Glicolisis y Lipogénesis) y nuestros datos de
 disminución de depósitos de glucógeno aumento del diámetro de las gotas
 lipídicas, es claro que la acción de los G.C. sobre el TAP, es fundamen-
 talmente lipogénica.

4ª.- Se produce una notable disminución de los enzimas mitocon-
 driales implicados en el ciclo de Krebs y aprovechamiento
 energético aerobio, como Deshidrogenasa Succínica y Mali-
 co, Citocromooxidasa y NADH Diaforasa mitocondrial, si bien el detrimen-
 to nunca es tan exagerado como el señalado por algunos autores en la —
 literatura, empleando los glucocorticoides a dosis ostensiblemente más
 altas. Y siendo que la degradación y obtención de energía a partir de —
 los ácidos grasos es la función más específica del TAP, podemos decir —
 que los glucocorticoides disminuyen sensiblemente esta acción fisiológi-
 ca.

5ª.- Se observa un ligero aumento de la actividad de enzimas
 lipolíticas y citoplásmicas, como Lipasa tisular y otras
 Esterasas inespecíficas, capaces de hidrolizar triglicé-
 ridos a glicerol y ácidos grasos; y si, como acabamos de señalar, estos

ácidos grasos no son utilizados por la propia célula a nivel mitocondrial, ni tampoco son reconvertidos en glucógeno a nivel citoplásmico como demuestra la disminución de depósitos de esta azúcar, podemos — concluir diciendo que tras una lipólisis ligeramente aumentada de los ácidos grasos liberados no serían utilizados por el propio adipocito, sino que pasarían al capilar para su posterior aprovechamiento en — otros tejidos.

6ª.- De todo lo anterior se deduce que los glucocorticoides, a la dosis empleada por nosotros, aumentan fundamentalmente la lipogénesis del TAP con el consiguiente incremento de — depósitos de triglicéridos y en menor medida la movilización de estos con liberación de los ácidos grasos al capilar, y sin que exista un aprovechamiento energético "in situ" a nivel mitocondrial ni citoplasmático de los mismos. Dado que esta última es la función más específica — del TAP (que lo diferencia del TAB), podemos decir que bajo acción — G.C., adipocito pardo vira su biología habitual de producción calorífica para pasar a funcionar de forma similar a la célula grasa blanca, — es decir, como depósito y regulador energético a través del almacenamiento y liberación de ácidos grasos.

7ª.- Las exageradas alteraciones enzimáticas observadas por — algunos autores (los cuales también detectan grandes variaciones en el peso y tamaño del TAP), parecen indudablemente consecutivas al empleo de dosis tóxicas de G.C. (10 veces superiores a las dosis empleadas por nosotros). Esto produciría una casi total anulación de la función mitocondrial forzando una excesiva lipogénesis. — Así, en nuestros estudios ultraestructurales nunca hemos hallado las alteraciones mitocondriales descritas por dichos autores, a nivel, tan — solo hemos detectado una disminución de los depósitos de glucógeno.

8^ª.— Hemos constatado la degranulación mastocitaria bajo la acción de la hidrocortisona, a la vez que corroboramos la hipótesis actual sobre el mecanismo de exocitosis o liberación de los gránulos, basada en una competitividad de los productos liberados con el sodio extracelular, que va acompañada de una pérdida de electrodensidad granular. Finalmente señalamos la utilidad que el estudio de esta exocitosis puede tener como medida indirecta de la actividad Lipoproteinlipasa.

9^ª.— Desde el punto de vista técnico, se aporta la modificación a la técnica de Pearse, para la Lipasa Tisular y su posible diferenciación de la actividad de otras esterases inespecíficas, considerando que el método idóneo en el TAP, es el siguiente: Tween 85, pH 7,2; Incubación a 37^ª durante 3 horas y contraste con nitrato de plomo al 1,5 %.

10^ª.— Por último, se intenta, aunque con resultados todavía no definitivos, crear la técnica para la demostración de la actividad Lipo-protein-lipasa en cortes histológicos, — únicamente realizada en la actualidad en homogeneizados de tejido y plasma. Para lo cual se hace una amplia valoración de diferentes substratos activadores e inhibidores, temperatura y pH óptimos, así como del tratamiento previo del tejido. Considerando como idóneo: El paso previo de los cortes por Acetona/Eter, durante 6 horas como disolvente de los lípidos, la utilización de VLDL y Quilimicrones como substrato, la adición de Heparina e iones NH_4 como activadores enzimáticos — y la incubación durante 2 horas a 37^ª. y pH 8. Encontrándose muchas — mas dificultades en la correcta determinación de los ácidos grasos, — producto de la acción enzimática, toda vez que con cualquiera de las técnicas empleadas se suman falsos positivos confirmando que de todas ellas, la que mejor demostración ofrece es el Reactivo de Schiff previo tratamiento ácido con peróxido, capaz de demostrar dobles en-

laces de ácidos grasos insaturados.

247

B I B L I O G R A F I A

B I B L I O G R A F I A

- 1.- RASMUSSEN. A.T.,
The so-called hibernating gland.
J. Morphol. 38, 147-205 (1823-1924)
- 2.- JOHANSSON. B.,
Brown fat: A review.
Metabolism. 8, 221-239 (1959)
- 3.- SMITH, R.E. and J.C. ROBERTS.
Thermogenesis of brown adipose tissue in cold - acclimated rats.
Ann. J. Physiol. 206, 143-148 (1964)
- 4.- BALL, E.G. and JUNGAS, R.L.
On the action of hormones with accelerate to rate of oxygen consumption and fatty acid release in rat adipose tissue in vitro.
Proc. Natl. Acad. Sci. US. 47, 932-941 (1961)
- 5.- FLEMING. W.
On the histogenesis of fixed cells and fat cell in connective - tissue.
Med. Centralbl. n° 31 (1870)
- 6.- FLEMMING, W.
On the formation and regression of fat cells in connective tissue with comment on the structure of the latter.
Arch. Mikroskop. Anat. 7, 32-77 (1871)

7.- FLEMING. W.

Ueber die Enterwicklung der Fettzellen und des Fettgewebes.
Arch. Anat. Physiol. 401-454 (1879)

8.- TOLOT. C.

Contribution to the histology and Physiology of adipose tissue
Sitzbec. Akad.Wiss.MathNaturwiss.Klasse 62, 445-446 (1870)

9.- HAMMER. J.A.,

Zur Kenntniss des Fettgewebes.
Arch.Mikoskop. Anat. Entwick. 45, 512-547 (1895)

10.- BELL. E.T. II

On the histogenesis of adipose tissue of the ox.
Am.J.Anat. 9, 412-438 (1909)

11.- FOOT. N.C.

Ueber das wachstum von Knochenmark in vitro. Experimenteller
Beitrag zur entstehung des Fettgewebwa.
Beitr. Pathol.Anat.Allgem.Pathol. 53, 446-476 (1912)

12.-KOLLIKER. A.

About the development of adipose tissue.
Anat. Anz. 1, 206-212 (1886)

13.- ROBIN.L.R. VAN and D.A.K. RONCARI

Complete differentiation of Adipocyte Precursors.
Cell and tissue Research. 195, 317-329 (1978)

- 14.- CLARK,E.K. and E.L. CLARCK.
Microscopic Studies of the new formation of fat in living adults rabbits.
Am.J.Anat. 67, 255-287 (1940)
- 15.- LEVI,G.
Tratato di Istologia: Unione tipografica.
Editrice torinese (1954)
- 16.- WASSEMAN,F.
The development of adipose tissue. In: Handbook of Physiology.
Sect.5. Adipose tissue.
Ed. by A.E. Renold and G.F.Cahill Jr. Washington D.C. Am.Physiology Soc. (1965), 87-100
- 17.- HULL,D.
The structure and function of brown adipose tissue.
Brit.Med.Bull. 22, 92-96 (1966)
- 18.- HULL,D. and M.M. SEGALL
Distinction of brown from white adipose tissue.
Nature. 212, 469-472 (1966)
- 19.- AHERNE,W. and D. HULL
Brown adipose tissue and heat production in the newborn infant.
J.Pathol Bacteriol. 91, 223-234 (1966)
- 20.- BARNARD,T.
The ultrastructural Differentiation of Brown Adipose tissue in the Rat.
J. Ultrastructure Research. 29, 311-332 (1965)

21.- SIDMAN,R.L.

Histogenesis of brown adipose tissue in vivo and in organ culture.
Anat. Record. 124, 581-601 (1956)

22.- SIMON,G.

Histogenesis. In:Handbook of Physiology,Sect.5. Adipose tissue.
Ed. by A.E. Renold and G.F. Cahill Jr. Washington D.C. Am.Physiol.
Soc. (1965) 101-107

23.- BARNARD,T. and O. LINDBERG

Ultrastructural Changes in the Chondriome During Perinatal Deve
lopment in Brown Adipose tissue of Rats.
J.Ultrastructure Research. 29, 293-310 (1969)

24.- BARNARD,T., J. SKALA and O.LINDBERG.

Changes in Interscapular Brown Adipose tissue of the Rat during
perinatal and early postnatal development and after cold acclima
tion.- I Activities of some respiratory enzymes in the tissue.
Comp.Biochem.Physiol. 33, 499-508 (1970)

25.- BARNARD,T., B.A. AFZELIUS and O. LINDBERG.

A Cytochemical Investigation into the Distribution of Cytochrome
Oxidase Activity within the Mitochondria of Brown Adipose tissue
from the Prenatal Rat.
J.Ultrastructure Research. preprint 1-23 (1971)

26.- SKALA, J., T. BARNARD and O.LINDBERG.

Changes in Interscapular Brown Adipose tissue of Rat during peri
natal and Early postnatal Development and after cold acclimation-II.
Mitochondrial changes
Comp.Biochem.Physiol. 33, 509-528 (1970)

- 27.- SKALA, J. and P. HAHN.

Changes in Interscapular Brown Adipose tissue of rat during perinatal and early postnatal development and after cold acclimation-VI. Effect of hormones and ambient temperature.

Int.J.Biochem. 5, 95-106 (1974)

- 28.- FLATMARK, T. and J.I. PEDERSEN.

Brown adipose tissue mitochondria.

Biochimica et Biophysica Acta 416, 53-103 (1975)

- 29.- DYER, H. McM. and B.J.S. PIRIE.

The growth in vitro of newborn rat brown and white adipose tissue.

J.Anat. 125, 3. 519-525 (1978)

- 30.- BARNARD, T. and J. SKALA.

The Development of Brown Adipose tissue. In: Brown Adipose tissue

Ed.O.Lindberg New York, London, Amsterdam: Elsevier, 35-40 (1970)

- 31.- NAPOLITANO, L.

Observations on the fine Structure of adipose cells.

Ann. New York Acad. Sci. 131, 34-42 (1965)

- 32.- NAPOLITANO, L.

The differentiation of white adipose cells: An electron microscope study.

J. Cell. Biol. 18, 665-679 (1963)

- 33.- SMALLEY, R.L., and K.N. SAMLLEY

Brown and white fats: Development in the hamster.

Science. 157, 1449-1451 (1967)

- 34.- FARRERAS ROTHMAN.
Medicina Interna. T. II
Sección Metabolismo y Nutricion
Ed. Marin. Barcelona. p. 536 (1978).
- 35.- LEWIS. B.M. and T.M. HAYER
The effect of age on deoxyribonucleic acid Synthesis in rat adipose.
Clinical Sci. and Mol.Mod. 48, 323-325 (1975)
- 36.-HELDMAIER. G. and HOFFMANN.K.
Melatonin Stimulates Growth of Brown Adipose tissue.
Nature. 247. 5 438, 224-225 (1974)
- 37.- AFZELIUS.B.A.
Brown adipose tissue. Its Gross Anatomy, Histology and Cytology.
In: Brown adipose tissue.
Ed.by O. Lindborg,Am.Elsevier Publishing Company,Inc.New York.
1970. p.20
- 38.- LINDBERG. O.
Brown O.Lindberg,Am.Elsevier Publishing Company,Inc.New York 1970
Citados a través de este autor los siguientes:
Taranov, Hess, Bradbury, Carey, Möller Barkow, Bargman, Koskimies,
Marshall, Clara, Luckenbill, Boerner-Patzelt, Umahara, Suter, y otros
- 39.-PAGE. E.
Body composition and fat deposition in rats acclimated to cold.
Rev. Can. Biol. 16, 269-275 (1957)
- 40.- CAMERON. I.L. and R.E. SMITH.
Cytological responses of brown fat tissue in cold-exposed rat.
J. Cell. Biol. 23, 89-100 (1964)

41.- JOEL.C.D.

The physiological role of brown adipose tissue. In: Handbook of Physiology. Sect. 5. Adipose tissue.

Ed. by A.E. Renold and G.F. Cahill Jr. Washington D.C. Am. Physiol. Soc. p.59-85 (1969)

42.- PAGE.E. and L.M. BABINEAU.

The effect of cold environment on the hibernating gland of the rat.

Rev. Can. Biol. 9, 202-206 (1950)

43.- SMITH.R.E. and B.A. HORWITZ.

Brown fat thermogenesis.

Physiological Reviews, 49, 330-425 (1969)

44.- PORTET.R., M. BEAU VALLET., G. BLANCHER., M. SOLIER.

Effect of Ambient temperature on Development and Composition of Brown Adipose tissue of Newborn Rat.

Comptes Rendus des Seances de la Société de Biologie. 172, 2, — 263- 268 (1978)

45.- DYER.R.F.

Morphological features of brown adipose cell maturation in vivo and in vitro.

Am. J. Anatomy. 123, 255-281 (1968)

46.- WASSEMANN.F. and MACDONALD.T.F.

The concept of the "Fat Organ". In: Fat as a tissue.

Ed. Rodahl K. and B. Issekutz.

McGraw-Hill Book Company. New York (1964) p.22-68

47.- DUBOIS, R.

Etude sur le mechanisme de la thermogenese et du Sommeil chez les Mammiferes.

Physiologie Comparés de la Marmotte. Ann.Univ.Lyon.Paris.Masson (1896) p. 268

48.- CARLIER, E.W.

Contributions to the histology of the hedgehog. V. the so-called hibernating gland.

J.Anat.Physiol. 27, 508-518 (1963)

49.- SIDMAN, R.L. and D.W. FAWCETT.

The effect of peripheral nerve Section on some metabolic responses of brown adipose tissue in mice.

Anat.Record. 118, 487-507 (1954)

50.- HULL, D. and M.M. SEGALL

Sympathetic nervous control of brown adipose tissue and heat production in the new-born rabbit.

J.Physiol (London) 181, 449-457 (1965)

51.- HULL, D. and M.M. SEGALL

The effects of sympathetic denervation and stimulation on brown adipose tissue in the new-born rabbit.

J.Physiol (London) 177, 63-64 P (1965)

52.- JOHANSSON, B.

Brown fat and its possible significance for hibernation.

Bull. Museum Comp. Zool. Harvard Coll. 124, 233-238 (1960)

- 53.- HAUSBERGER,F.X.
Über die Innervation des Feltorgane. In Brown adipose tissue.
Ed.O.Lindberg. (Ver referencia 38)
- 54.- SIDMAN.R.L., M.PERKINS and WIENER.
Noradrenaline and adrenaline content of adipose tissues.
Nature, 193, 36-37 (1962)
- 55.- WEINER.N., M.PERKINS and R.L. SIDMAN.
Effect of reserpine on noradrenaline content of innervated and
denervated brown adipose tissue of the rat.
Nature 193, 137-138 (1962)
- 56.- STOCK. K. and E.O. WESTERMANN.
Concentrations of norepinefrine, serotonin and histamine and of
amine-metabolizing enzymes in mammalian adipose tissue.
J.Lipid.Res. 4, 297-304 (1963)
- 57.- WIRSEN.C.
Adrenergic innervation of adipose tissue examined by fluorescence
microscopy. In Brown Adipose tissue.
Ed. O.Lindberg (Referencia 38)
- 58.- WIRSEN.C. and B. HAMBERGER
Catecholamines in brown fat.
Nature 214, 625-626 (1967)
- 59.- DERRY. O.M., E. SCHONBALM and G.STEINER.
Two sympathetic nerve supplies to brown adipose tissue of the rat.
Can.J.Physiol Pharmacol. 47, 57-63 (1969)

- 60.- DAWKINS, M.J.R., S.DUCKETT and A.G.E. PEARSE.
Localization of catecholamins in brown fat.
Nature. 209, 1144-1145 (1966)
- 61.- FLAIM.K.E., J.M. HOROWITZ and B.A. HORWITZ.
Functional and Anatomical Characteristics of the Neuve-Brown
Adipose Interactions in the Rat.
Plogers Archiv. 365, 9-14 (1976)
- 62.- LINCK.G., M.E. STOECKEL., A. PORTE and A. PETROVIC.
An electron microscope study of the specialized cell contacts
and innovation of adipocytes in the brown fat of European —
hamster (Cricetus cricetus).
Cytobiologia 7,4 . 431-436 (1973)
- 63.- SLAVIN,B.G. and K.W. BALLARD.
Morpholical Studies on the Adrenergic Innervation of white —
Adipose tissue the Anatomical.
Record. 191,3, 377-389 (1978)
- 64.- BARGMANN.W., G.U.HEHN, and E. LINDNER.
Uber die Zellen des braunen Fettgewbs und ihre Innervation in
Brown Adipose tissue.
Ed. O.Lindberg (Referencia 38)
- 65.- LAURY,M.C., et R. PORTET.
Effects de L'ablation partielle de la graisse brune et de L'ad
ministration de teophilline sur la response cabrigenique a la
Noradrenaline chez le rat adapté au froid.
Rev.Can.Biol. 33, 15-25 (1974)

- 66.- BEALVALLET, M., R. PORTET, G. BLANCHER and M. SOLIER.
Postnatal development of brown adipose tissue in the rat bred
at 23° or 28°C.
Arch.Int. de Physiol et Bioch. 86, 145-152 (1978)
- 67.- WASSERMANN, F.
The concept of the Fat Organ: In Fat as a tissue.
Ed. by K. Rodahl and B. Issekutz. MacGraw-Hill Book Company
New York (1962) p.22-40.
- 68.- JANSKY, L.
Non-Shivering thermogenesis.
Proceeding of the Symposium. Ed. by L.Jansky. Swets and Zeitlin
ges N.U. Amsterdam (1971) p. 159-170
- 69.- JANSKY, L.
Non-shivering thermogenesis and its thermoregulatory Significance.
Biol. Rev. 48,85-132 (1973)
- 70.- SMITH, R.E. and R.J. HOLK.
Brown fat: thermogenic effector of arousal in hibernation
Science 140, 199-200 (1963)
- 71.- PRUSSINER, S., B. CANNON and O. LINDBERG.
Mechanism Controlling Oxidative Metabolism in brown adipose
tissue (1970) (ver referencia 38 p. 283-312).
- 72.- NICHOLLS, D.G.
Cellular mechanisms in brown fat thermogenesis mitochondria.
Experientia 33, 1130-1131 (1977)

- 73.- CHRISTIANSEN, E.N. and L. WOJCZAK
Regulation of inorganic phosphate exchange in brown adipose tissue mitochondria.
Comp. Biochem. Physiol. 44B, 579-592 (1974)
- 74.- CHRISTIANSEN, E.N., J.I. PEDERSEN and H.J. GRAV.
Uncoupling and recoupling of oxidative phosphorylation in brown adipose tissue mitochondria.
Nature 222, 857-860 (1969)
- 75.- FLATMARK T. and J.I. PEDERSEN.
Brown adipose tissue mitochondria
Biochim. et Biophys Acta 46, 53-103 (1975)
- 76.- REED N. and J.N. FAIN.
Potassium-dependent stimulation of respiration in brown fat — cells by fatty acids lipolytic agents.
J.Biol.Chem. 243, 6077-6083 (1968)
- 77.- BOYER, P.D.
Oxidases and Related Redox Systems.
Ed. by T.E. King, H.S. Mason and M. Morrison.
John Wiley, New York (1964) p. 994-1008
- 78.- GIRARDIER, L., J. SEYDOUX and T. CLAUSEN.
Membrane potential of brown adipose tissue.
J.Gen.Physiol. 52, 925-940 (1968).
- 79.- HORWITZ, B.A., J.M. HOROWITZ and R.E. SMITH.
Norepinephrine-induced depolarization of brown fat cell:
Proc.Natl. Acad.Sci. US. 64, 113-120 (1969)

80.- HOROWITZ. J.M. and R.E. PLANT.

Controlled cellular energy conversion in brown adipose tissue thermogenesis.

Am. J. Physiol. 235. R121- R129 (1978)

81.- HOROWITZ. B.A.

Dubain-sensitive component of brown fat thermogenesis.

Am. J. Physiol. 224, 352-355 (1973)

82.- NICHOLLS. D.G.

Hormonal control of brown adipose tissue metabolism.

Biochem. Soc.trans. 5, 908-912 (1977)

83.- BLAIRS. T.W. and P.E. LANGLEY.

Ibid 75, 983-997 (1971a) (citados por Itaya referencia 84)

84.- ITAYA. K.

Differences in responsiveness to adipokinetic agents between white epididymal and brown interscapula adipose tissue from rats.

J.Pharm.Pharmac. 30, 632-637 (1978)

85.- MOSKOWITZ J. and G. KRISHNA

The effect of Prostaglandin E₁ on Norepinephrine induced membrane depolarization and cyclic AMP accumulation in brown fat cells.

Pharmacology 10, 129-135 (1973)

86.- REED. N. and J.N. FAIN.

Hormonal regulation of the metabolism of free brown fat cells:

In Brown Adipose tissue referencia 38 p. 207-224

- 87.- KHOD. J.C., A.A. AUINO and D. STEINBERG.
The mechanism of activation of hormone-sensitive lipase in human adipose tissue.
J.Clin.Invest. 53, 1124-1131 (1974)
- 88.- FELDMAN, D. and D. LOOSE.
Glucocorticoid Receptor in Adipose tissue.
Endocrinology 100, 398-405 (1977)
- 89.- FELDMAN, D.
Evidence that Brown Adipose tissue is a glucocorticoid target Organ.
Endocrinology 103, 2091-2097 (1978)
- 90.- FELDMAN, D. and M. HIRST
Glucocorticoid adn regulation of phosphoenolpiruvate carboxykinase activity in rat brown adipose tissue.
Am. J. Physiol. 235, E 197- E 202 (1978)
- 91.- SKALA, J. and HAHN, P.
Effects of single cortisone injections ou brown adipose tissue of developing rats.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 49, 501-507 (1971)
- 92.- SEIFTER, J., J.J. CHRISTIAN and W.E. EHRLICH.
Effect of cortisone and other steroids on the hibernating gland of the pregnant white fat.
Fed. Proc. 10, 334-340 (1951)

93.- LACHANCE. J.P.

Quelques aspects de la biochimie du tissu adipeux brun interscapulaire chez la rat blanc.

Laval. Med. 18, 1258-1290 (1953)

94.- WERTHEIMER. E. and B. SHAPIRO

The physiology of adipose tissue.

Physiol. Rev. 28, 451-460 (1948)

95.- LACHANCE. J.P. and E. PAGE

Hormonal factors influencing fat deposition in the interscapular brown adipose tissue of white rat.

Endocrinology 52, 57-64 (1953)

96.- ENGEL. F.L. and J.L. SCOTT Jr.

The role of hormones in adipose glycogen synthesis in the rat: the adrenal cortex.

Endocrinology 48, 56-64 (1951)

97.- KIMBERG, D.U., U. LOUD and J. WIENER

Cortisone induce alterations in mitochondrial function and structure.

J. Cell. Biol. 37, 63-79 (1968)

98.- HEATON G.M. and D.G. NICHOLLS.

Hamster Brown adipose tissue mitochondria.

Eur. J. Biochem. 67, 511-517 (1976)

- 99.- BRYER, R.L. and R.R. HARRIS.
Metabolic fate of fatty acids in the carnitine cycle of brown
adipose tissue mitochondria.
Biochim. et. Biophys. Act. 380, 370-381 (1975)
- 100.- MEHSMANN, M.J. and G. PHINNEY
Glycerokinase activity in liver and adipose tissue of develop-
ping swine (sus domesticus)
Int.J. Biochem. 4, 575-579 (1973)
- 101.- HAHN, P. and Z. DRAHOTA
The activities of citrate cleavage enzyme acetyl-CoA synthetase
and lipoprotein lipase in white and brown adipose tissue and the
liver of the rat, during development.
Experientia 22, 706-709 (1966)
- 102.- PAULT, C., J.C. FRUCHART, P. DEWAILLY, J. JAILLARD and G. SEZILLE.
Experimental studies on the regulation of myocardial and adipose
tissue lipoprotein lipase activities in rat.
Biochem. and Biophys. Res. Comm. 59, 160-166 (1974)
- 103.- DUKES/SWENSON
Hormonas suprarrenales. En: Fisiologia de los animales domésti-
cos.
Tomo II. Ed. Aguilar. Madrid (1978)
- 104.- THOMPSON, E.B. and E. LIPPMAN.
Mechanism of action of glucocorticoids.
Metabolism 23 (2) 159-202 (1974)

- 105.- SLAUNWHITE. W.R. Jr., G.N. LOCKIE, N. BACH and cols.

Inactivity in vivo of transcortin-bound cortisol

Science 135, 1062-1063 (1962)

- 106.- MATSUI N. and J.N. FLAHER.

An in vitro physiological activity of protein-bound and unbound cortisol.

Endocrinology 78, 1159-1164 (1964)

- 107.- MAJOR. P.W. and KILPATRICK

Cyclic AMP and hormone action.

J. Endocrinol. 54, 593 (1972) (ver referencia 82 p. 163)

- 108.- WICK. W.D.

Differential effects of glucocorticoids and adenosine 3', 5'-monophosphate on hepatic enzyme synthesis.

J. Biol.Chem 246 (10) 217-223 (1971)

- 109.- ROSENFELD. M.G. and B.W. O'MALLEY.

Steroid Hormones: Effects on adenylyl cyclase activity and adenosine 3', 5'-monophosphate in target tissues.

Science 168, 253-255 (1970)

- 110.- KISSEL. J.H., M. G. ROSENFELD, L.R. CHASE et B.W. O'MALLEY.

Response of chick oviduct adenylyl cyclase to steroid hormones.

Endocrinology 86, 1019-1023 (1978)

- 111.- CZECH. M.P. and J.N. FAIR.

D-Actinomycin inhibition of dexamethasone action on glucose metabolism in white fat cells.

Biochim. Biophys Acta 230, 185-203 (1971)

- 112.- FAIN, J.N.
Inhibition of lipolytic action of growth hormone and glucocorticoid by ultraviolet and X-radiations.
Science 157, 1062-1064 (1967)
- 113.- BAXTER, J.D., G.C. ROUSSEAU, M.C. BENSON, R.L. GARCEA, J. ITO and G.M. TOMKINS.
Role of D.N.A. and specific cytoplasmic receptors in glucocorticoid action.
Proc.Natl.Acad.Sci.US, 69, 1892-1896 (1972)
- 114.- MARKMAN, M.H., S. NAKAGAWA, S. DVORKIN et al.
Inhibitory effects of cortisol and antibiotics on substrate entry ribonucleic acid synthesis in rat thymocytes in vitro.
J.Biol.Chem. 245, 2556-2563 (1970)
- 115.- NAKAGAWA, S. and A. WHITE.
Acute decrease in RNA polymerase activity of rat thymus in response to cortisol injection.
J.Biol.Chem. 245, 1448-1457 (1970)
- 116.- VAN DER MEULEN, N., R. MARX, C.E. SEKERIS et al.
Differential effects of cortisone on nucleolar and extranucleolar RNA synthesis of rat thymocytes.
Exp. cell. Res. 76, 606 (1972) (Referencia 82 p.178)
- 117.- ABRAHAM, A.D. and C.E. SEKERIS
Inhibitory action of steroid hormones on RNA synthesis of isolated thymus nuclear.
Biochim.Biophys Acta. 247, 562-569 (1971)

118.- MUNCK, A.

Glucocorticoid inhibition of the glucose uptake by peripheral tissues. Old and new evidence. Molecular mechanism and physiological significance.

Prospect. Biol. Med. 14, 265 (1971) (referencia 82 p.178)

119.- DREWS, J.

The effect of prednisone injected in vivo on RNA synthesis in - ret thymus cells.

Eur. J. Biochem. 7, 200-208 (1969)

120.- SAJDEL, E.M. and S.T. JACOB.

Mechanism of early effect of hydrocortisone on the transcriptional process: Stimulation of the activities of purified rat liver nucleolar RNA polymerase.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 43, 707-715 (1971)

121.- COHEN P. and C. KIDSON

Interactions of hormonal steroids with nucleic acids. I. A specific requirement for guanine.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 63, 458-464 (1969)

122.- SANDBERG, A.A. and W.R. SLAUNWHITE

Physical state of adrenal cortical hormones in plasma.

In: Human Adrenal Cortex. Ed. by N.P. Christy

New York. Harper and Row (1971) p. 69

123.- KOSTYO, J.L. and A.F. REDMOND.

Role of protein synthesis in the inhibitory action of adrenal - steroid hormones on amino-acid transport by muscle.

Endocrinology 79, 531-540 (1966)

- 124.- ALLEN, C. and J.W. KENDALL
Maturation of the Circadian Rhythm of Plasma Corticosterone
in the Rat.
Endocrinology 80, 926-930 (1967)
- 125.- LEVIN, R. and S. LEVINE.
Development of circadian periodicity in base and stress level
of corticosterone.
J. of Physiology 219, 1397-1399 (1975)
- 126.- SCHWARTZ, D.
Methodes statistiques a l'usage des medecins et des biologistes.
Ed. Medicales. Flammarion. Flammarion et Cie (1963)
- 127.- SACHS, L.
Estadística Aplicada.
Ed. Labor, S.A. Julio (1978)
- 128.- KENDALL, M.G.
A course in multivariate analysis.
Ed. Griffin. London (1957)
- 129.- MORRISON, D.F.
Multivariate statistical methods.
Ed. Mac Graw Hill. New York (1967)
- 130.- RAO, C.R.
Advanced statistical methods in biometric research.
Ed. Wiley. New York (1952)

131.- McMANUS J.F.A. and R.W. MOWRY

Técnica Histológica.

Ed. Atika S.A. Madrid (1968)

132.- BARKA T. and P.J. ANDERSON

Histoquímica

Ed. Atika. Madrid (1969)

133.- PEARSE, A.G.E.

Histochemistry Theoretical and Applied.

Ed. Churchill Ltd. London (1960)

134.- BRANCROFT J.D. and A. STEVENS

Theory and practice of histological techniques.

Ed. Churchill Livingstone. London (1977)

135.- OGAWA, K.T., T. SAITO and H. MAYAHARA

The site of ferricyanide reduction by reductases within mitochondria as studied by electron microscopy.

J. Histochem Cytochem 168, 49-57 (1968)

136.- GLAUERT, A.M.

Practical Methods in Electron Microscopy V.3.

Ed. North-Holland Publishing Company - Oxford (1976)

137.- VAGUE, J. P. RUBIN, J. JUBELIN, G. LAM-VAN, F. AUBERT, A.M.

WASSERMANN and J. FONDARI.

The regulation of the adipose tissue mass. International Congress. Series n° 315 (ISBN 90219 0 0 225 7). Proceeding of the IV International Meeting of Endocrinology.

Ed. by J. Vague and J. Boyer. Marseilles. July 10-12 (1973)

- 138.- FAWCETT, D.W. and I.C. JONES.
The effects of hypophysectomy, adrenalectomy and thiouracil feeding on the cytology of brown adipose tissue.
Endocrinology 45, 609-671 (1949)
- 139.- SEYLE, H. and P.S. TIMIRAS.
Participation of brown fat tissue in the alarm reaction.
Nature, 64, 745-746 (1949)
- 140.- ARONSON, S.M., C.U. TEDDORU, M. ADLER and G. SCHWARTZMAN.
Influence of cortisone upon brown fat of hamster and mice.
Proc.Soc. Exptl. Biol. Med. 85, 214-218 (1954)
- 141.- MAZZUCHELLI, M.U., C. CONFALONIERI and P. SCHLECHTER.
The nervous system and lipid metabolism of adipose tissue.
Influence of denervation on lipogenetic activity of adrenocortical hormones.
Metabolism, 10, 330-334 (1961)
- 142.- FAIR, J.N.
Comparison of Glucocorticoid effects of Brown and white Adipose tissue of the Rat.
Endocrinology. 76, 549-552 (1965).
- 143.- HAHN, P., Z. DRAHOTA, P. SKALA., S. KAZDA and M.E. TOWELL.
The effect of cortisone on brown adipose tissue of young rat.
Can.J.Physiol. Pharmacol. 47, 975-980 (1969)
- 144.- ROTHBARD, M.J.
Am Midland Naturalis, 59, 246 (1958)
Citado por Sims y cols. (ver referencia siguiente).

- 145.- SIMS, R.A., R. ALLEN and S.E. SULKIN.

Influence of Pregnancy and Cortisone treatment on Brown Adipose tissue in Bats.

Proc. Soc. Exptl. Biol.Med. 111, 455-458 (1962)

- 146.- DRAHOTA, Z., E. HONAVA and P. HAHN

The effect of ATP and cortisone on the endogenous respiration of mitochondria from brown adipose tissue.

Experientia. 24, 431-432 (1968)

- 147.- KIMBERG D.V., J.N. LOEB.

Effects of cortisone administration on rat liver mitochondria.

Support for the concept of mitochondria fusion.

J. Cell Biol. 55: 635-640 (1972)

- 148.- TEODORU, C.V. and E. GRISHMAN

Alterations of the interscapular brown fat (hibernating gland) adrenals and thymus during pregnancy in hamsters.

Endocrinology. 68, 208-214 (1961)

- 149.- SUTER, E.R., and W. STAUBLI.

An Ultrastructural histochemical study of brown adipose tissue from neonatal rat.

J.of Histochemistry and Cytochemistry 18, 100-106 (1976)

- 150.- SUTER, E.R.

The fine structure of brown adipose tissue.

II. Perinatal development in the rat.

Laboratory Investigation 21, 246-253 (1969)

- 151.- THOMSON J.F., D.E. SMITH, S.L. NANCE and D.A. HABECK
Some metabolic characteristics of brown fat, with particular reference to the mitochondrial.
- 152.- UMAHARA Y.
Light and electron microscopic studies on the brown adipose tissue in the rat.
Archiv. Histol. Japon 29, 459-509 (1968) .
- 153.- BUJANI VARELA, M.J.
Estudio Histoquímico del tejido adiposo pardo.
Facultad Complutense de Medicina. Madrid (1978)
- 154.- KORN, E.D. and T.W. QUIGLEY.
Studies on lipoprotein lipase of rat heart and adipose tissue.
Biochim Biophys. Acta 18, 143 (1955) citado in Handbook of physiology. Sect. 5. Adipose tissue.
Ed. A.E. Renold and G.F. Cahill Jr.
American Physiological Society Washington D.C. 1965 cap. 28
- 155.- SCOW R.O., E.J. BLANCHETTE-MACKIE and L.C. SMITH
Role of Capillary Endothelium in the Clearance of Chylomicrons
A model for lipid transport from blood by lateral diffusion in cell membranes.
Clinical Research. 39, 149-162 (1976)
- 156.- UMNAS B.
Chemistry and Storage function of Mast Cell granules
The J. of Investigate Dermatology 71, 76-80 (1978)

- 157.- ASHMORE J., G.F. LAHILL., R. HILLMAN and A.E. RENOLD
Adrenal cortical regulation of hepatic glucose metabolism.
Endocrinology 62, 621-628 (1958)
- 158.- DICULESCU, J.
Sur certains caracteres métaboliques du tissu adipeux éclaircis par voie histochimiques.
Ann. Histochem. 11, 88-110 (1966)
- 159.- OHKAWA K.I., M.T. VOGT and E. FARBER.
Unusually high mitochondrial alpha glycerophosphate dehydrogenase activity in rat brown adipose tissue.
J. of Cell. Biol 41, 441-449 (1969)
- 160.- INGLE, D.J.
Some studies on factors which influence tolerance for carbohydrates.
J.Clin. Endocrinol. 10, 1312-1315 (1950)
- 161.- FAWCETT, D.W.
Differences in physiological activity in brown and white fat as revealed by histochemical reactions.
Science 105, 123-128 (1947)
- 162.- GEORGE, J.C. and J. EAPEN
A histological and histochemical study of the brown and — yellow adipose tissue of the bat.
Hipposideros specun Quart. J. Microscop. Sci. 100, 369-375 (1959)

163.- OKSANEN A.

Multilocular fat in thymuses of rats and mice associated with thymus involution: A light and electron microscopy and histochemical study.

J. Path. 105, 223-230 (1971)

164.- MENSCHIK Z.

Histochemical comparison of brown and white adipose tissue in guinea pigs.

Anat. Record. 116, 439-455 (1953)

165.- STEINER G. and G.F. CAHILL Jr.

Lipogenesis in homogenates of brown adipose tissue.

Federation Proc. 23, 167-172 (1964)

166.- HAHN P., O. KOLDOVSKY., J. KRECEK., J. MARTINEZ and Z. VACEK

Endocrine and metabolic aspects of the development of homeothermy in the rat. in CIBA Foundation.

Symposium somatic stability of the Newly Born. E. Wolstenholme and D'connor. Boston: Little, Brown and Co. p. 331-355 (1961)

167.- GOMORI G.

Microtechnical demonstration of sites of Lipase activity

Proc. Soc. Exptl. Biol Med. 58, 362-366 (1945)

168.- NACHLAS M.M. and A.M. SELIGMAN

The histochemical demonstration of Esterase.

J. of. Cancer Inst. 9, 415-418 (1949)

169.- GOMORI G.

Histochemistry of esterases

Int. Rev. Citol. 1, 323-325 (1952)

170.- NAGATA T. and F. MURATA.

Supplemented studies on the method for Electron Microscopic demonstration for lipase in the Pancreatic acinar cell of mice and rats.

Histochemie 29, 8-15 (1972)

171.- PEARSE, A.G.E.

The tween method for diase (after Gomari) in Histochemistry theoretical and Applied.

Ed. J. and A. Churchill Ltd. London 1960 p. 888-889

172.- SIURALA M.

Lipase activity of gastric mucosa of man under pathological conditions.

Acta. path microbiol. Scand 39, 268-271 (1956)

Autor: MARIA JULIA BUJAN VARELA

Titulo: HISTOBIOLOGIA DE LA GRASA PARDA. ACCION DE LA
HIDROCORTISONA SOBRE EL TEJIDO ADIPOSEO PARDO.
EFECTOS CUALITATIVOS Y CUANTITATIVOS.

Director: Prof. Dr. D. LUIS ZAMORANO SANABRA

DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID 1.980

Volumen II

Lámina I

Fig. 1.- Panorámica de la grasa parda interescapular. (X 63)

2.1



Lámina II

Fig. 2.- Adipocitos pardos, poligonales, multiloculares y con núcleo central. (X 400 ampliada a 19.200)

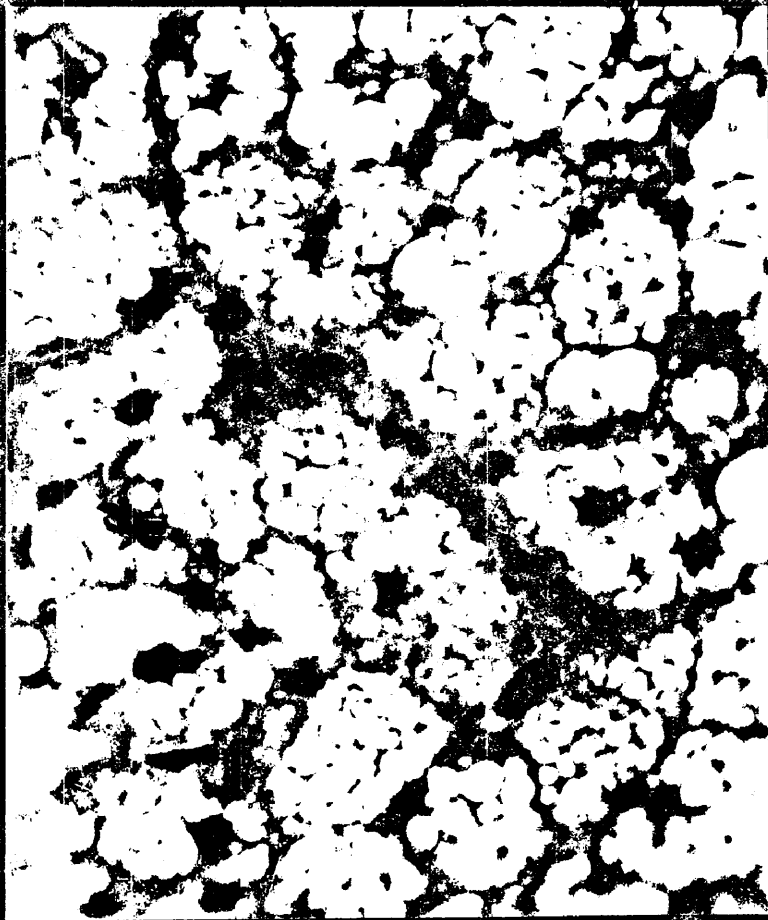


Lámina III

Fig. 3a.- Fosfatasa alcalina mostrando actividad capilar. (X 400)

Fig. 3b.- Adenosintrifosfatasa en la que se aprecia la actividad del lecho vascular. (X 160)

13

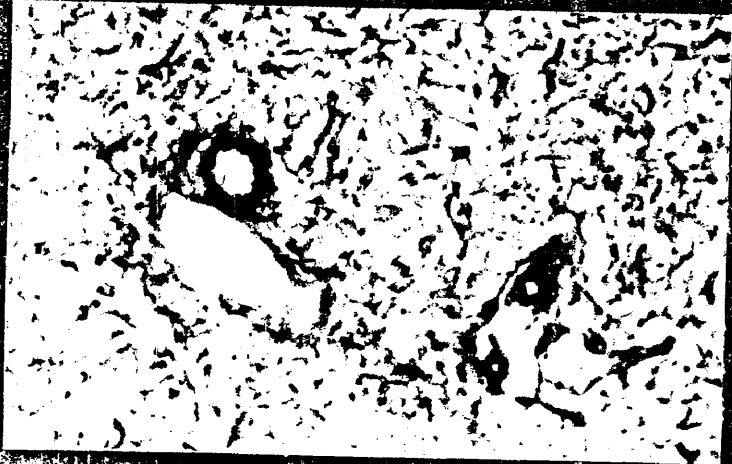


Lámina IV

Fig. 4.- Reticulina. Disposición en malla rodeando a los adipocitos pardos.
(X 400)

Fig. 5.- Células cabecadas en el tejido adiposo pardo. (X 400)

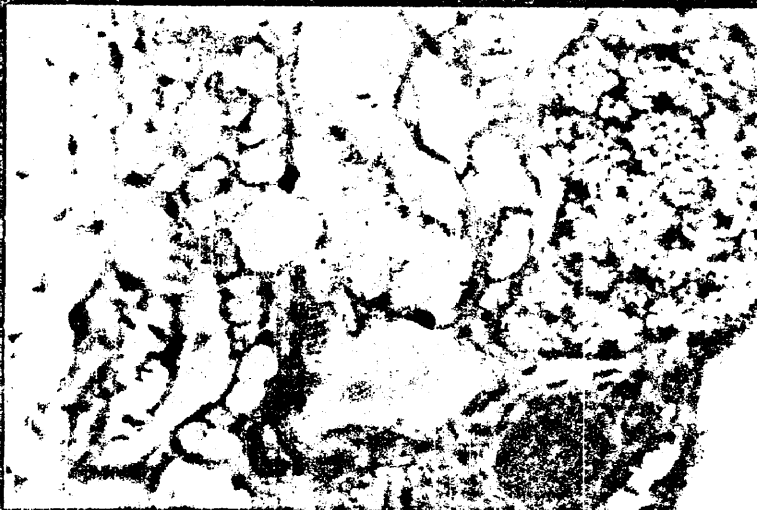
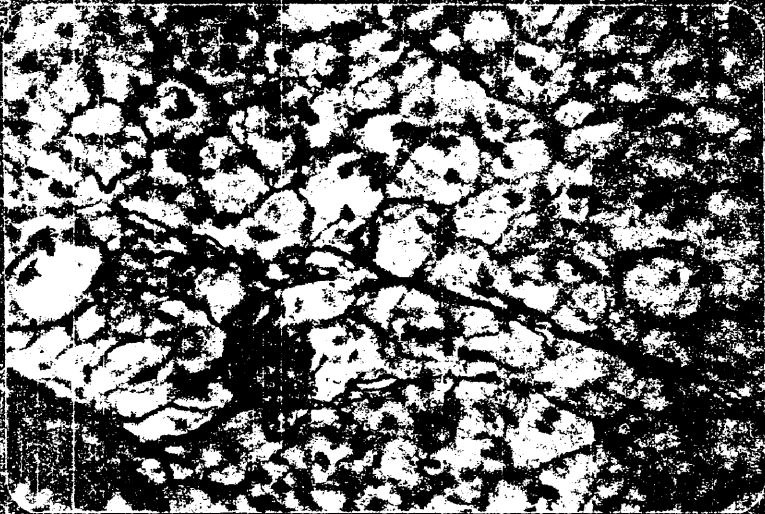


Lámina V

Fig. 6.- Vacuolas lipídicas de los adipocitos no rodeados de membranas limitantes, sino del propio hialoplasma. (X 400 amplificada a 19.200)



Lámina VI

Fig. 7.- Membrana basal (x 28.000)

Fig. 8.- Panorámica electromicroscópica de los adipocitos pardos, citoplasma con fino caracter granular conteniendo las inclusiones lipídicas (x 3.000)

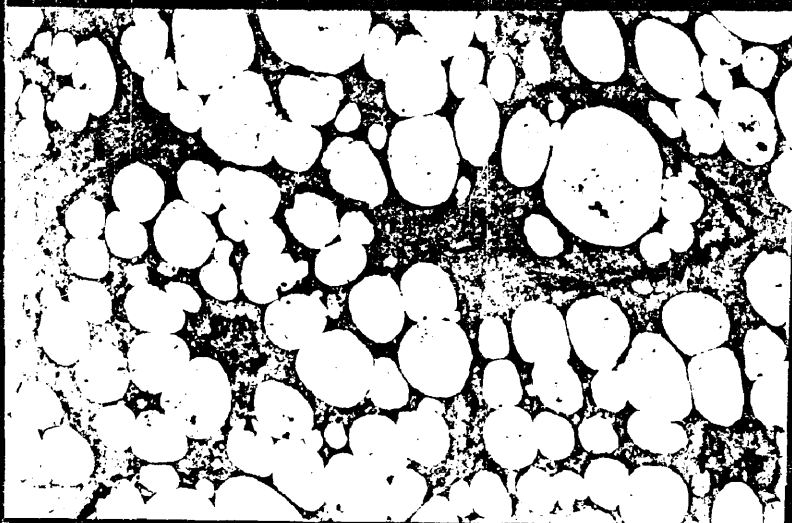


Lámina VII

Fig. 9.- Mitocondrias pleomórficas de crestas paralelas estrechamente empaquetadas (X 19.200)

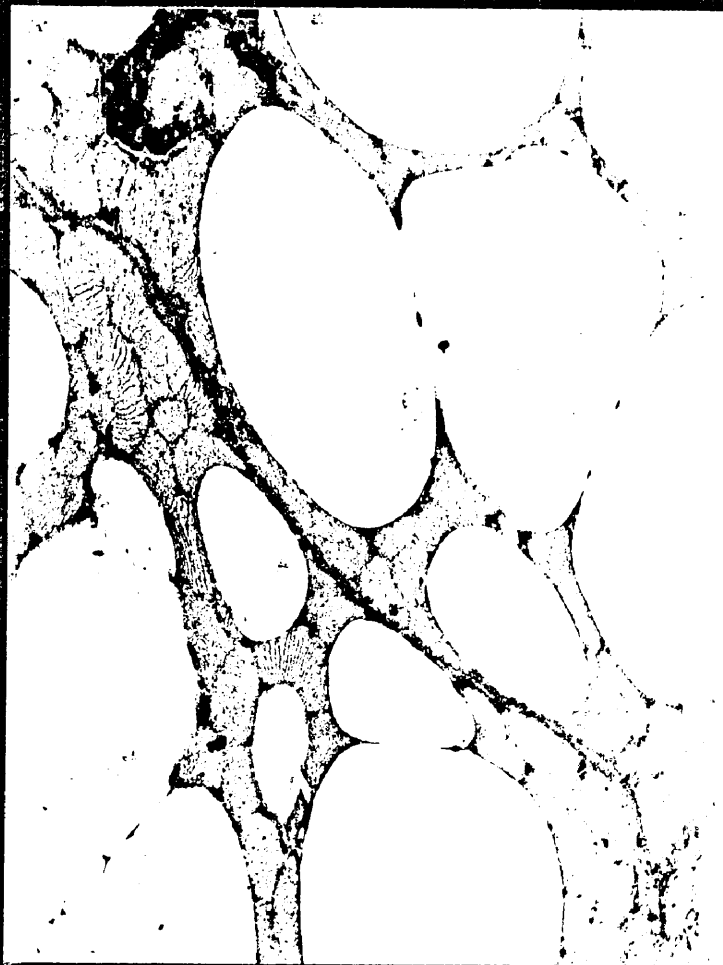


Lámina VIII

Fig. 10.- Inclusiones de glucógeno ocupando practicamente el espacio intermitocondrial. (X 20.000)

Fig. 11.- Lisosomas. (X 26.000)

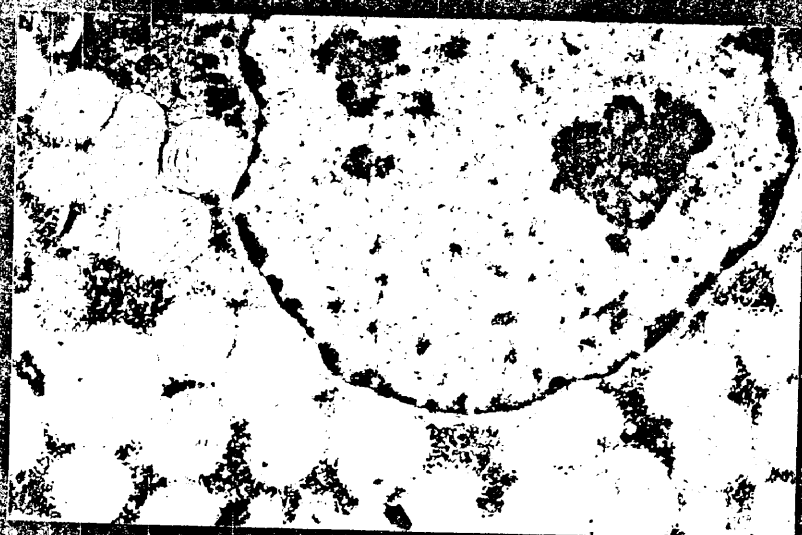


Lámina IX

Fig. 12a.- Contraste lipídico con ácido ósmico en rata control. (X 400)

Fig. 12b.- Contraste lipídico con ácido ósmico en adipocitos de ratas inyectadas. Obsérvese la tendencia a coalescer de las gotas. (X 400)

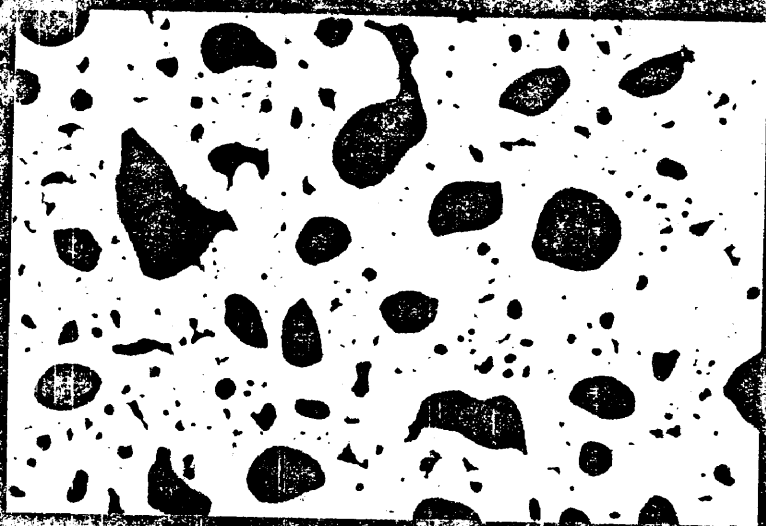
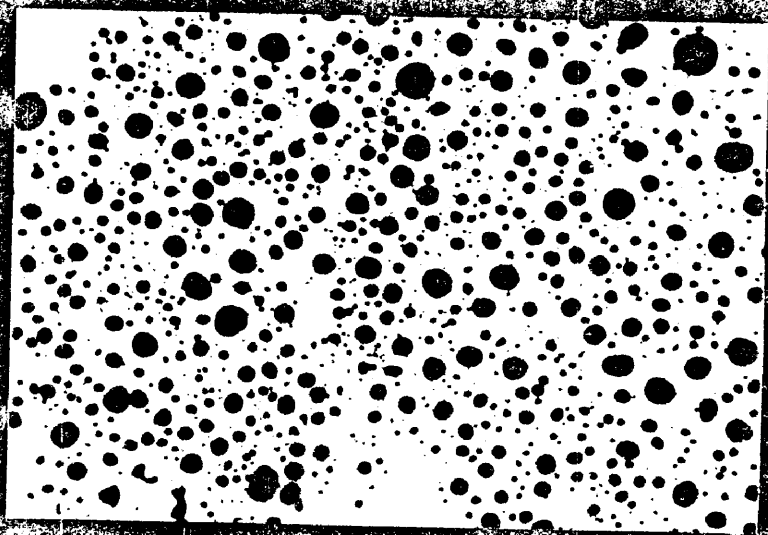


Lámina X

Fig. 13a.- Sudán negro mostrando los lípidos intensamente teñidos de adipocitos controles. (X 400)

Fig. 13b.- Sudán negro para contraste lipídico en adipocitos inyectados.
(x 400)

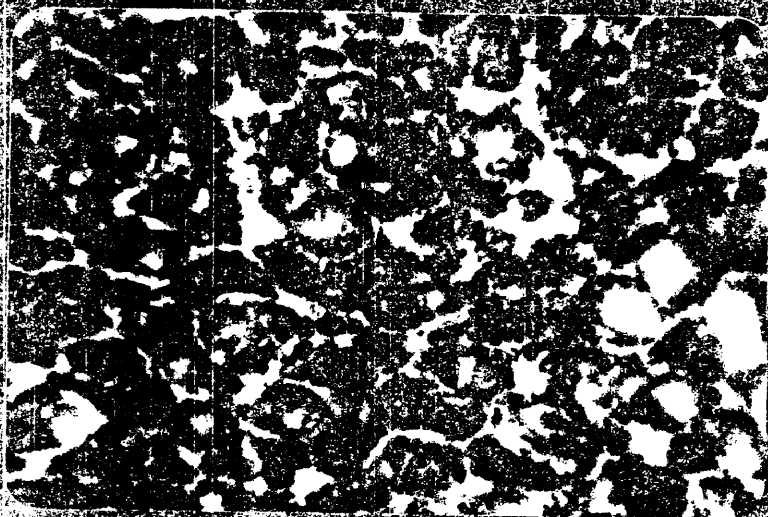
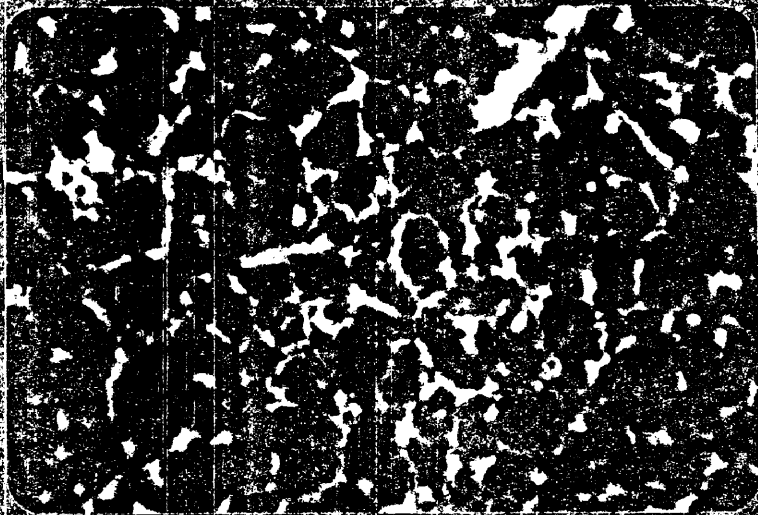


Lámina XI

Fig. 14a.- Sudén rojo para contraste lipídico en adipocitos controles. (X 400)

Fig. 14b.- Sudén rojo en adipocitos inyectados. (X 400)

211



Lámina XII

Fig. 15a.- Oil Red mostrando intensa actividad en adipocitos controles.
(X 400)

Fig. 15b.- Oil Red en adipocitos inyectados. (X 400)

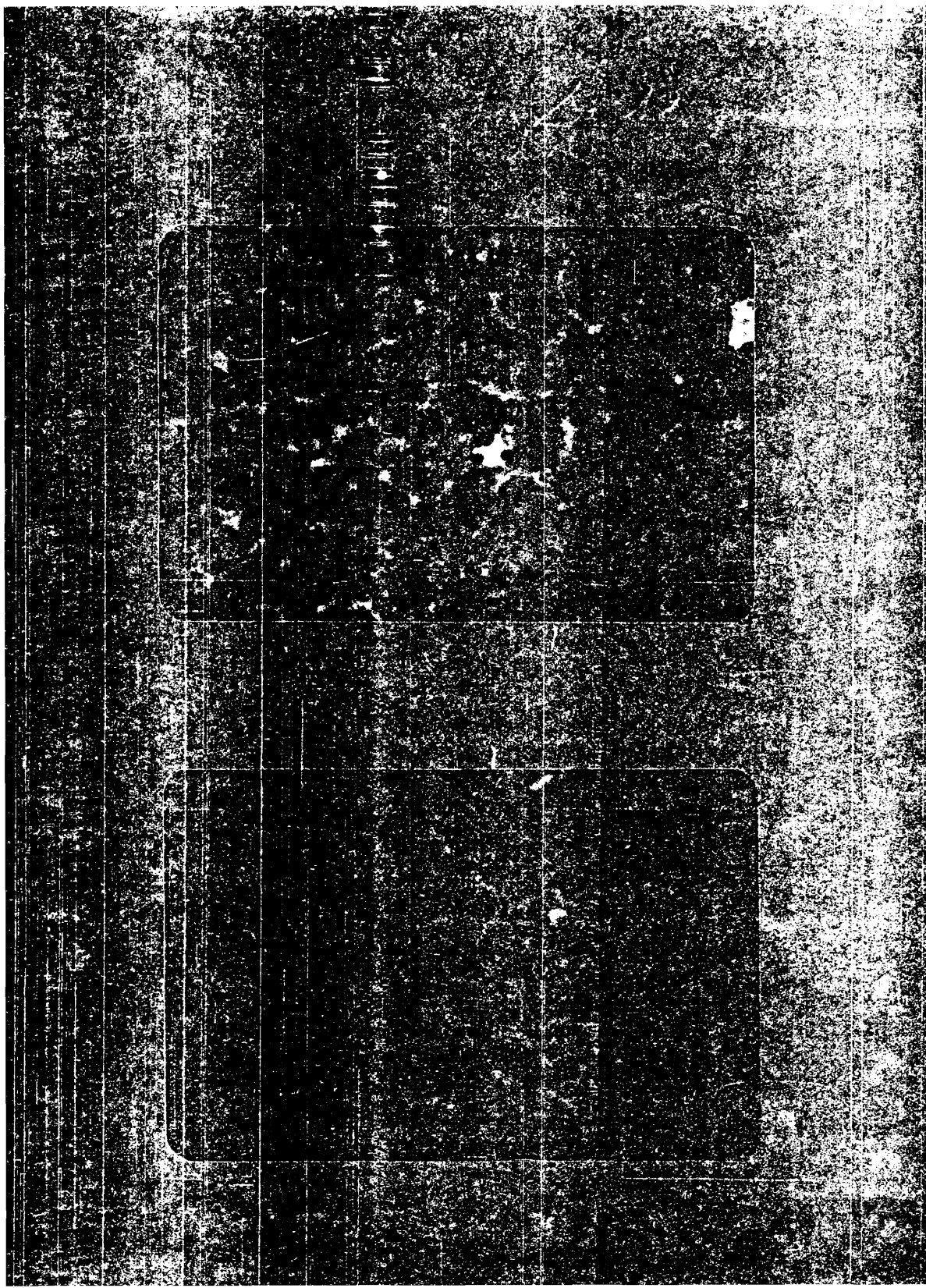


Lámina XIII

Fig. 16a.- Hematoxilina - Eosina en adipocitos controles. (X 400)

Fig. 16b.- Hematoxilina - Eosina en adipocitos inyectados. (X 400)

2519

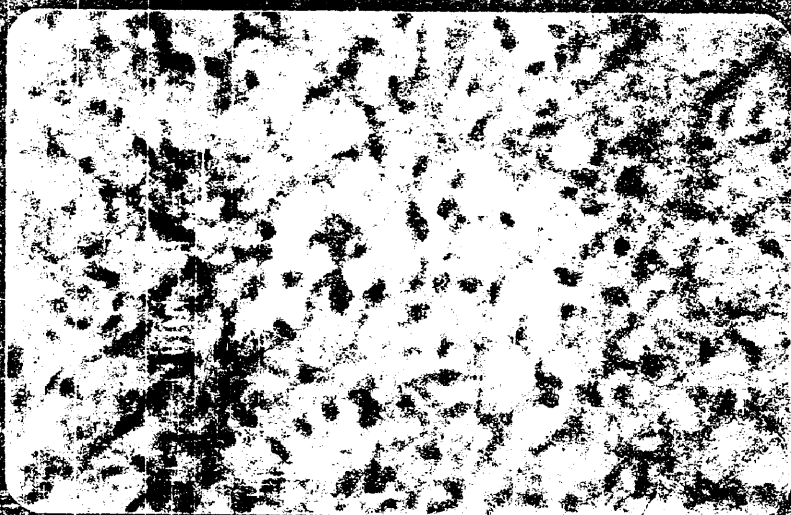
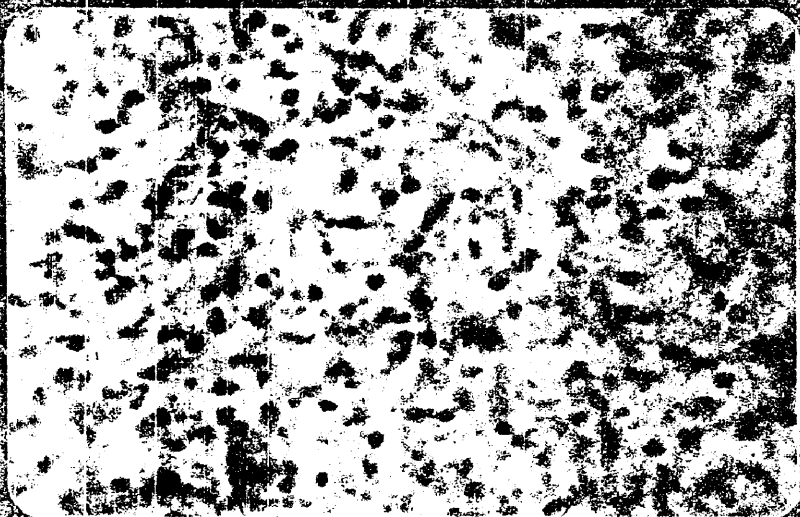


Lámina XIV

Fig. 17.- Van Gieson. Finos tabiques conjuntivos delimitando los adipocitos.
(X 400)

Fig. 18.- Reticulina y colágena. Las fibras se disponen a modo de red rodeando
a los adipocitos. (X 400)

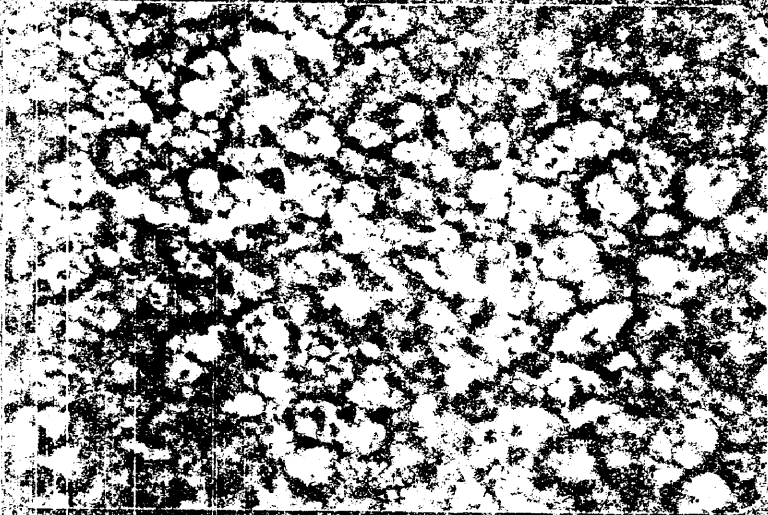


Lámina XV

Fig. 19.- Presencia de mucopolisacáridos con la técnica de PAS. (X 400)

Fig. 20.- Mastocitos repletos de granulaciones metacromáticas. (X 400)

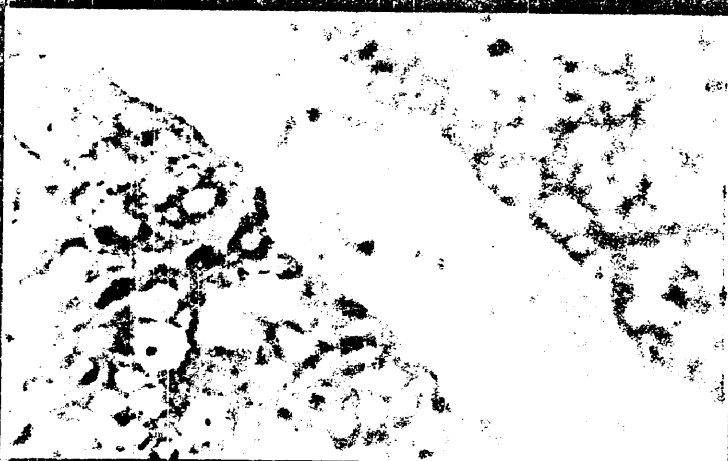
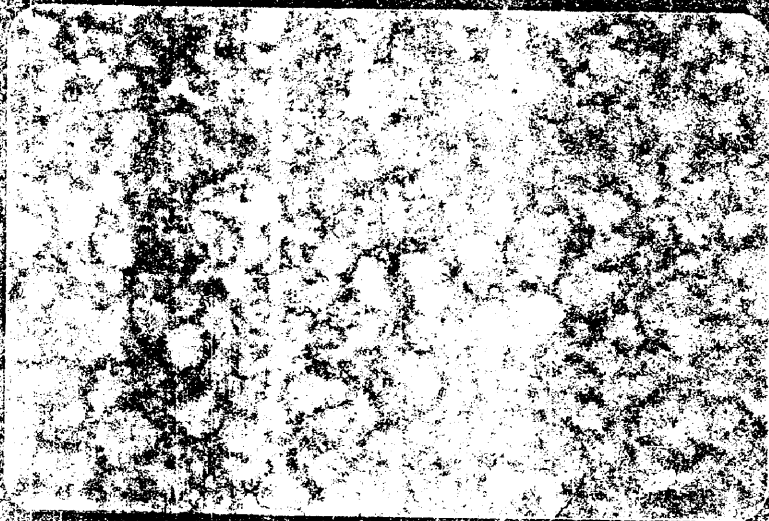


Lámina XVI

Fig. 21a.- Tamaño habitual para técnicas de contejes y mediciones en rata control. (x 400, amplificada a 19.200)



Lámina XVII

Fig. 21b.- Tamaño habitual para técnicas de contajes y mediciones en rata
inyectada. (X 400, amplificada a 19.200)

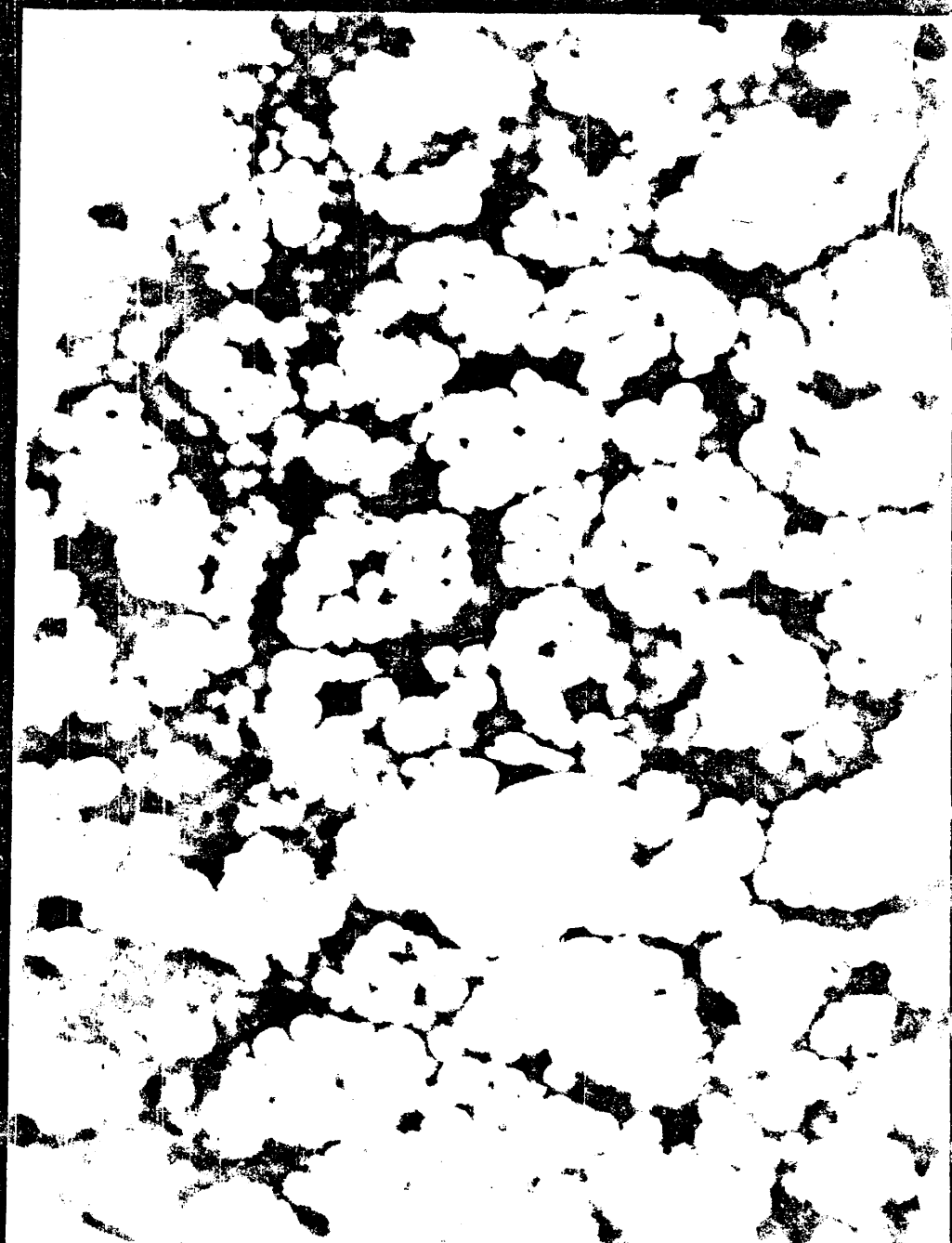


Lámina XVIII

Fig. 22a.- Azul de toluidina, panorámicas del tejido adiposo pardo de ra
ta control con gran número de gotas por adipocito. (X 400)

Fig. 22b.- Azul de toluidina, observese respecto a la anterior como las
gotas lipídicas son mayores tendiendo a la coalescencia. (X 400)

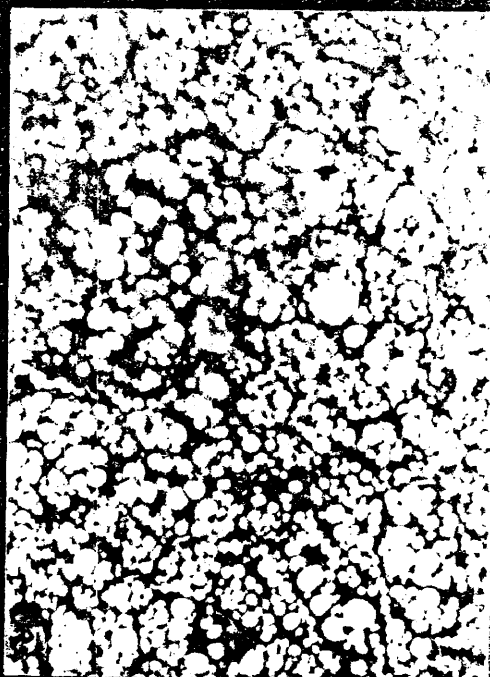
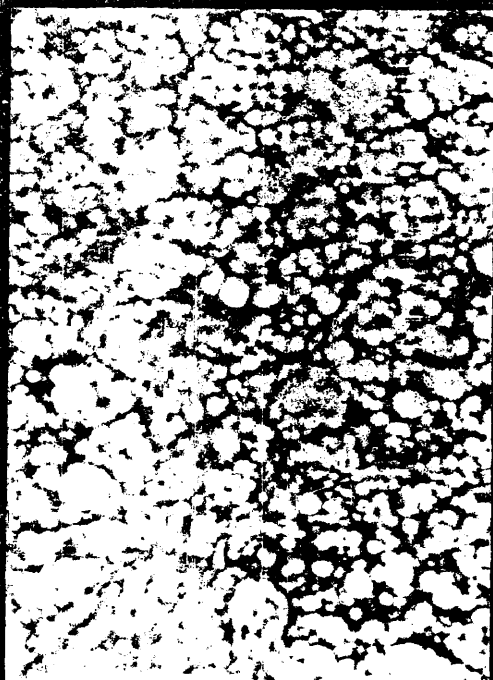
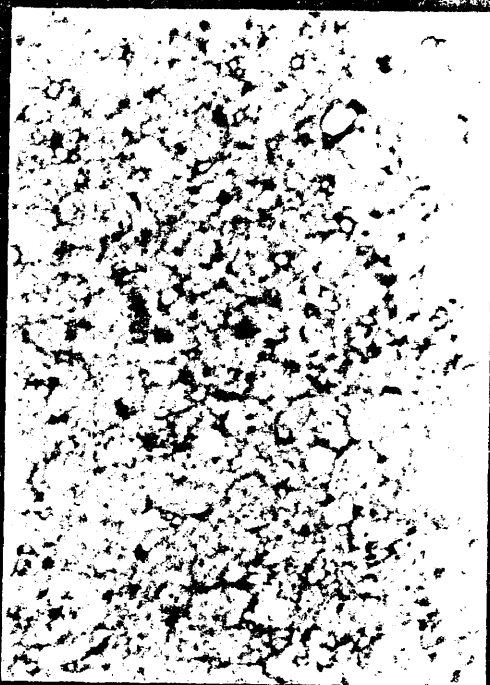
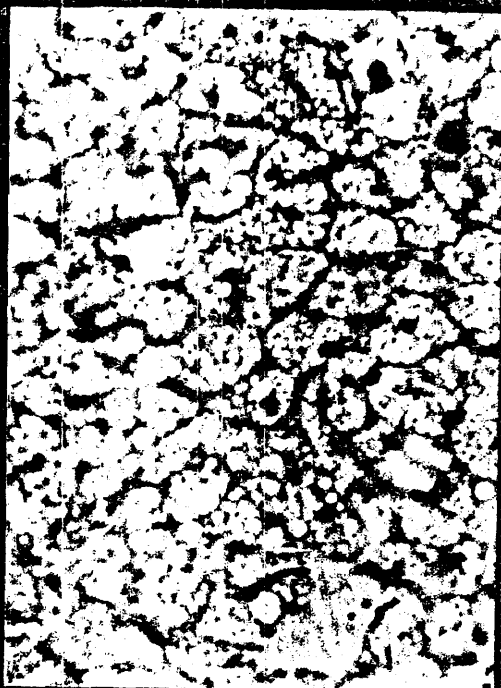


Lámina XIX

Fig. 23.- Mastocitos de tejido adiposo pardo control. Obsérvese su contorno bien delimitado. (X 1.000)

Fig. 23b.- Mastocitos de tejido adiposo pardo inyectado. Obsérvese su degr
mulación. (X 1.000)

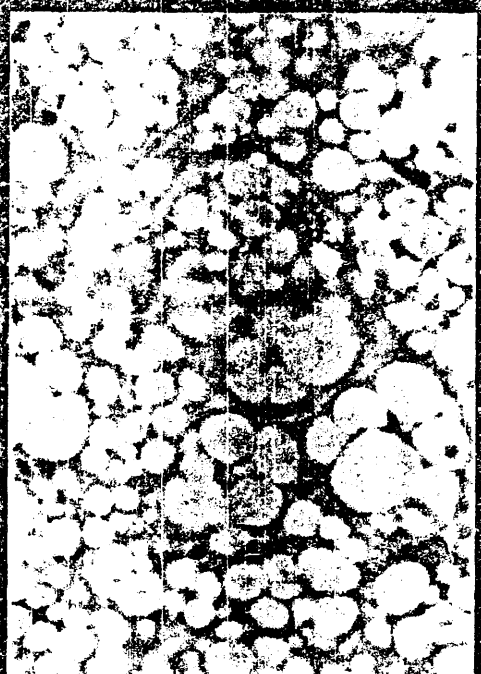


Lámina XX

Fig. 24.- Septos conjuntivos donde se pueden apreciar fibras colágenas -
cortadas transversalmente (a) y longitudinalmente (b) (X 10.000)

Fig. 25.- Finos tabiques delimitando los adipocitos (X 12.000)

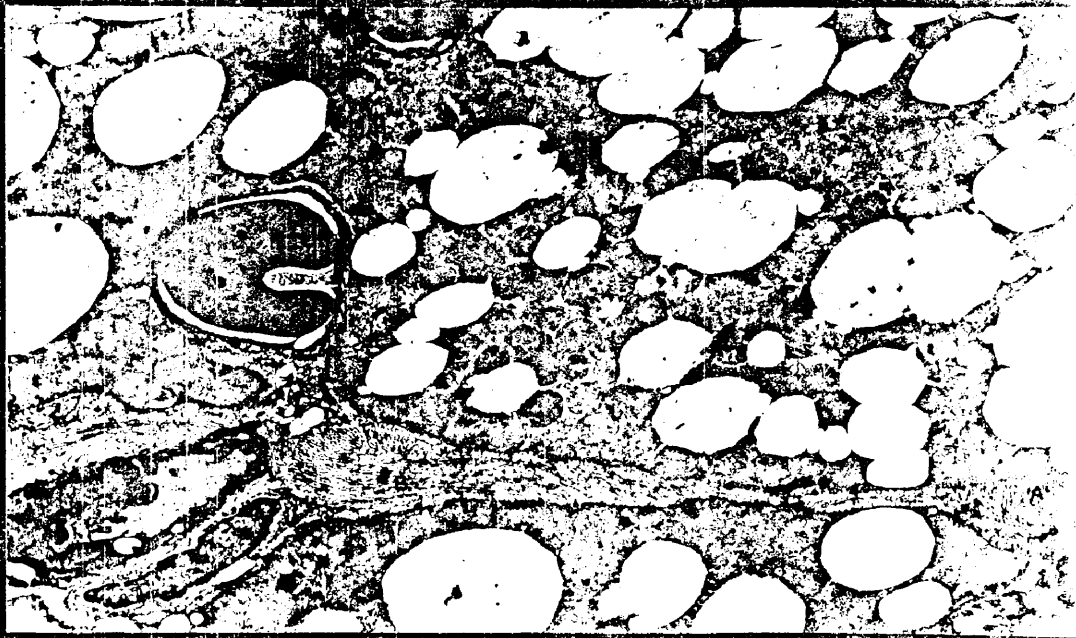


Lámina XXI

Fig. 26a.- Fibroblasto en espacio intercelular. (X 15.000)

Fig. 26b.- Fibroblasto a mayor aumento. (X 20.000)

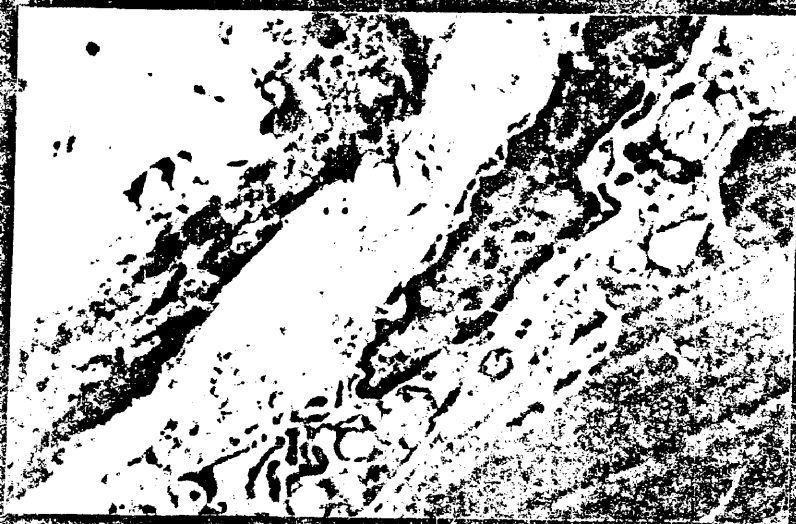


Lámina XXII

Fig. 27a.- Red capilar rodeando al adipocito pardo control. Obsérvese las secciones capilares. (c) (X 8.000)

Fig. 27b.- Red capilar rodeando al adipocito inyectado (X 6.800)

152

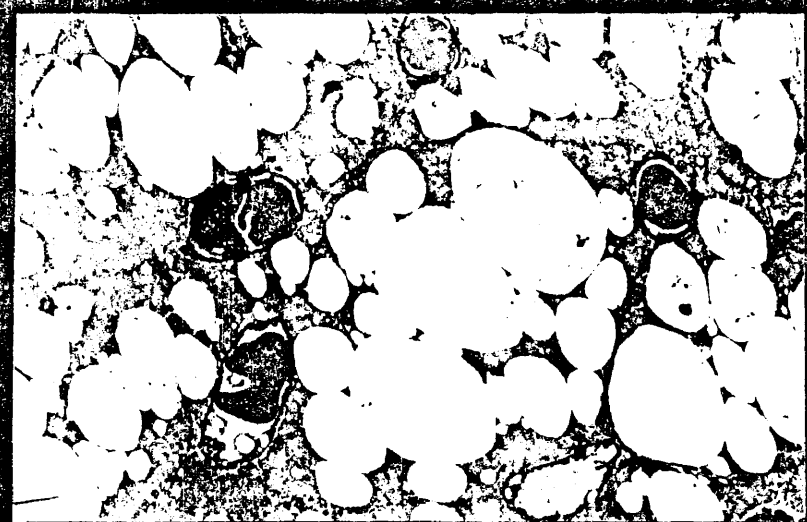
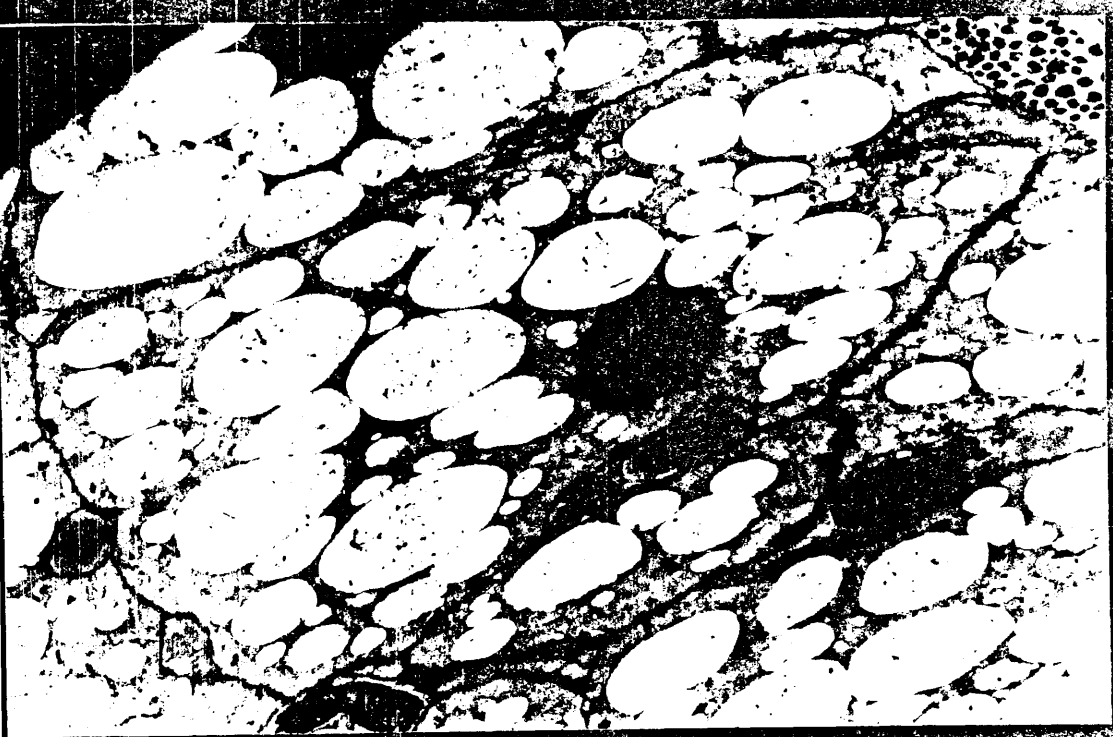


Lámina XXIII

Fig. 28.- Pericito envuelto por la membrana basal de la célula endotelial.
(x 20.000)

1450



Lámina XXIV

Fig. 29.- Célula endotelial (X 12.000)

Fig. 30.- Célula de Schwann en tejido adiposo pardo (X 26.000)



Lámina XXV

Fig. 31.- Célula mesenquimal con marcado caracter macrofágico (X 15.000)

Fig. 32.- Célula mesenquimal conteniendo numerosas vacuolas electroclaras.
(X 12.600)



Lámina XXVI

Fig. 33.- Célula mesenquimal con vacuolas densas y claras. (X 15.000)

Fig. 34.- Cuerpos lisosómicos de morfología variada pertenecientes al mismo tipo celular. (X 16.100)



Lámina XXVII

Fig. 35.- Mastocito en tejido adiposo pardo de ratas controles con sus típicas granulaciones densas. (X 8.000)



Lámina XXVIII

Fig. 36.- Anterior a mayor aumento. (X 15.000)



Lámina XXIX

Fig. 37.- Detalle de las granulaciones mastocitárias. Granos homogéneamente densos. (X 35.000)

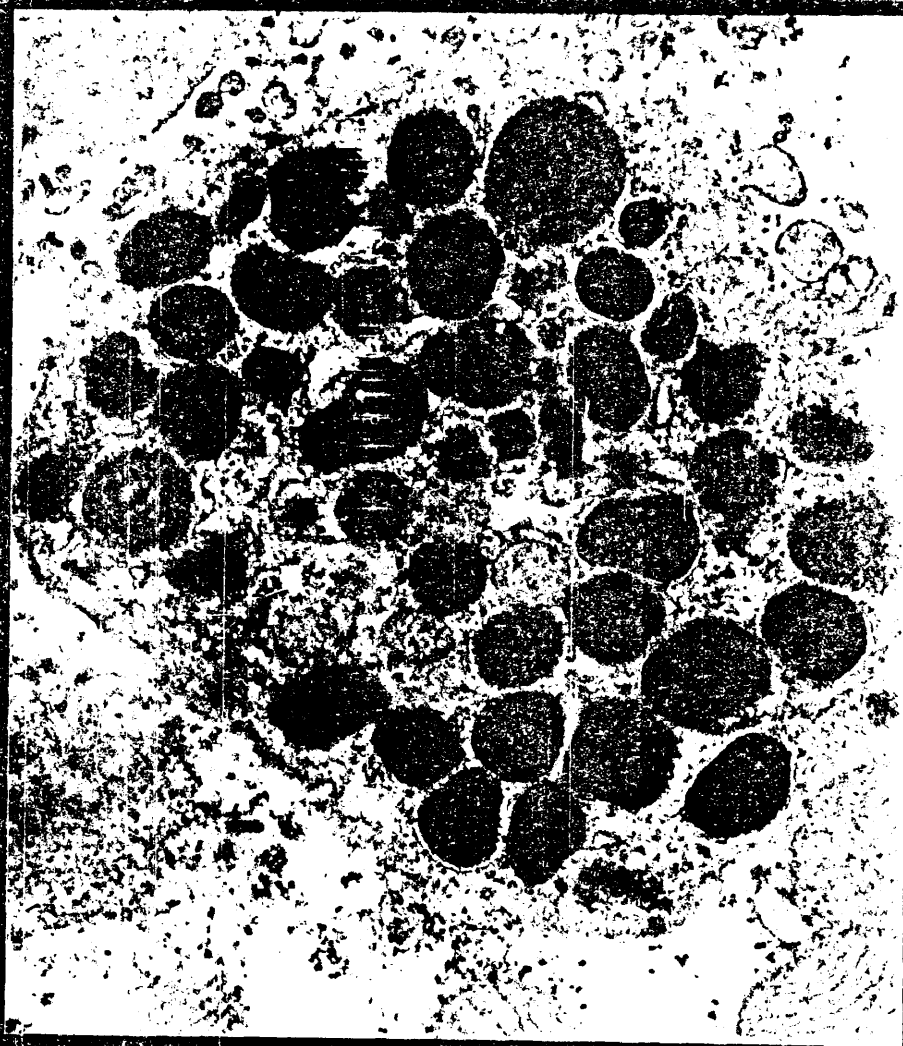


Lámina XXX

Fig. 38.- Mastocito junto a célula tipo mesenquimal (X 8.000)

Fig. 39.- Anterior a mayor aumento mostrando las granulaciones mastocitarias en rata control. (X 12.000)

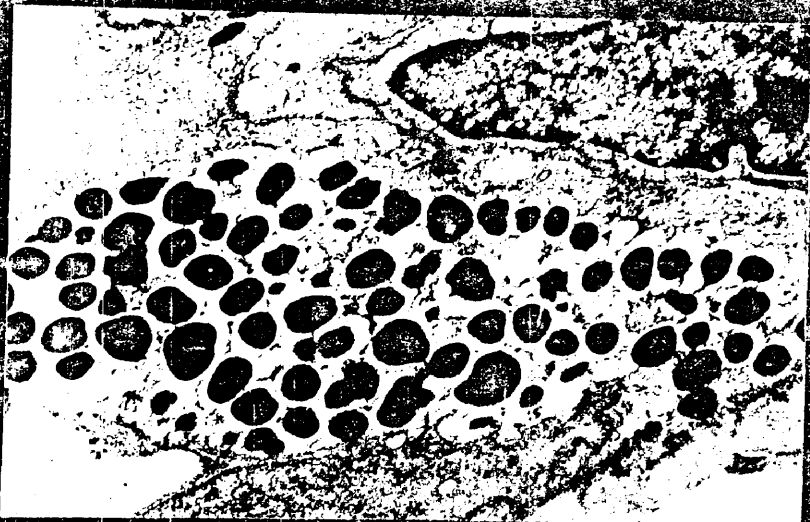


Lámina XXXI

Fig. 40.- Mastocito de tejido adiposo pardo bajo tratamiento con hidrocortisona. Obsérvese la presencia de cavidades comunicadas con el exterior, signo de degranulación mastocitaria. (X 17.500)

Fig. 41.- Obsérvese gránulos mastocitarios con pérdida de electrodensidad y repliegues de membrana con cavidades ópticamente vacías, con signos de activación celular. (X 16.000)



Lámina XXXII

Fig. 42.- Adipocito poligonal conteniendo inclusiones lipídicas perfectamente delimitadas. (x 8.000)

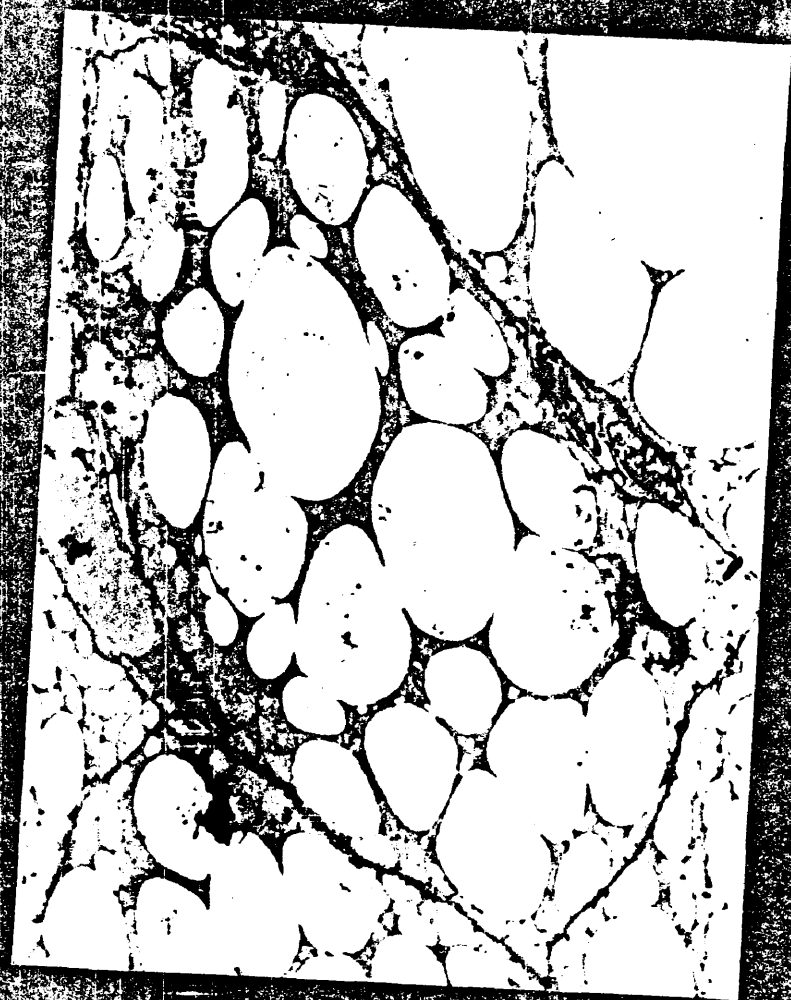


Lámina XXXIII

Fig. 43.- Límite entre dos adipocitos pardos presentando finas invaginaciones de membrana. (X 62.500)

Fig. 44.- Desmosoma puntiforme. (X76.000)



Lámina XXXIV

Fig. 45.- Núcleo adipocito pardo, forma oval y nucleólo aparente (X 28.000)

Fig. 46.- Núcleo adipocito pardo de cromatina laxa y nucleólo reticular.
(X 31.100)

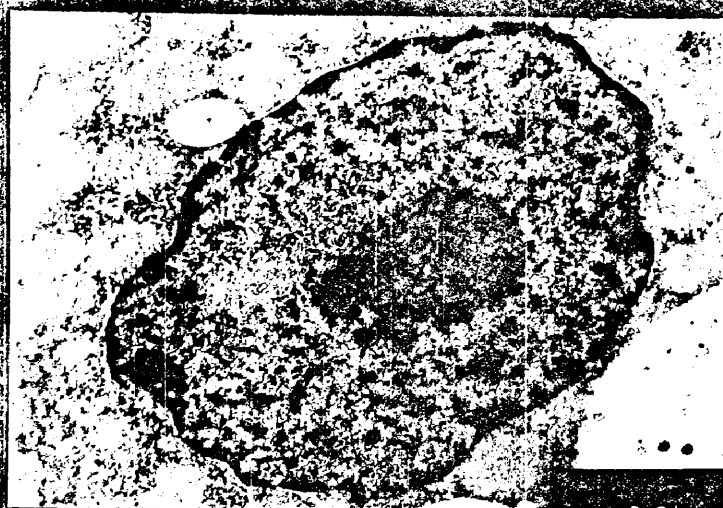


Lámina XXXV

Fig. 47.- Detalle de mitocondria con gránulo electrodensso (X 72. 000)

Fig. 48.- Detalle del glucógeno. (X 75.000)



Lámina XXXVI

Fig. 49.- Gran cantidad de glucógeno entre las mitocondrias en adipocitos
controlas. (X 40.000)

Fig. 50.- Igual a la anterior. (X 35.000)

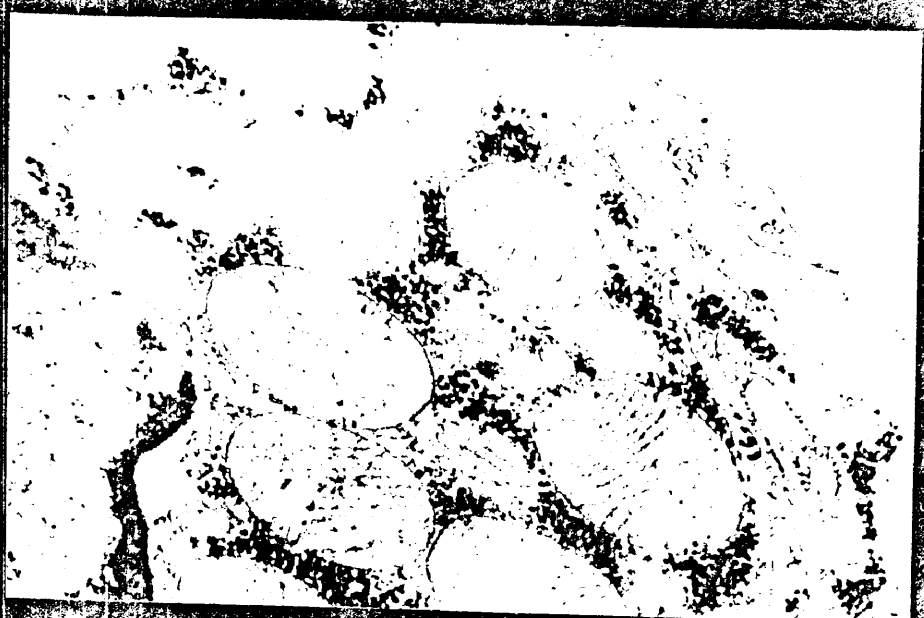


Lámina XXXVII

Fig. 51.- Panorámica de tejido adiposo pardo de ratas bajo tratamiento -
esteroides donde se puede apreciar una clara disminución del
glucógeno. (X 18.000)

Fig. 52.- Disminución de glucógeno en el hialoplasma de los adipocitos -
inyectados. (X 43.500)

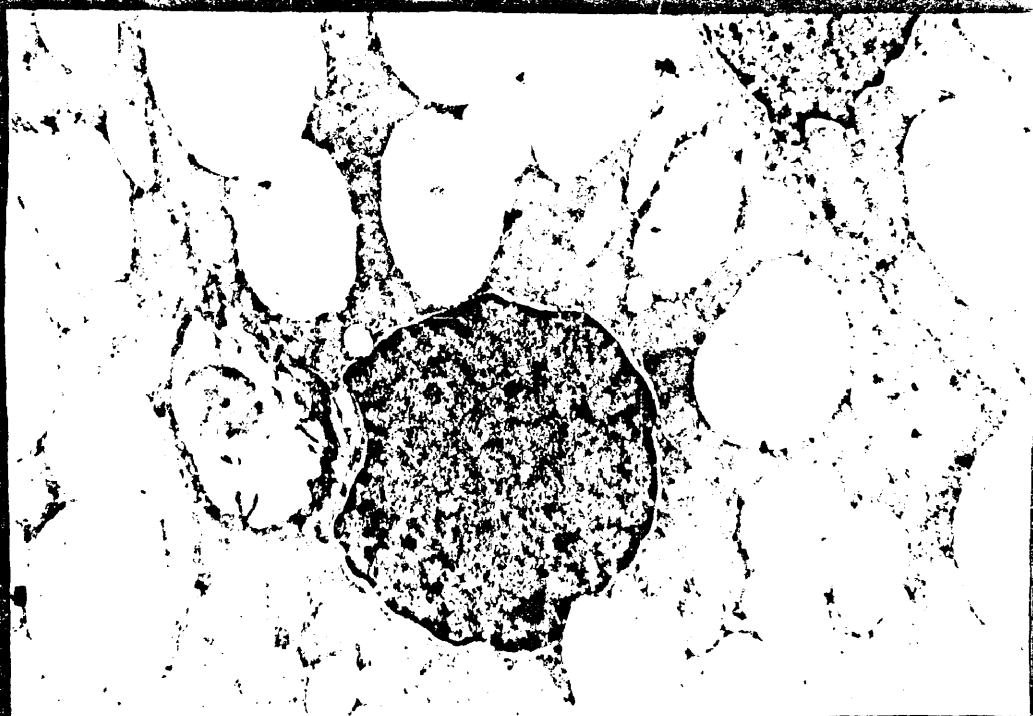


Lámina XXXVIII

Fig. 53.- Panorámica de un adipocito pardo mostrando núcleo (n), mitocondrias (m) y gotas lipídicas (l) rodeadas por retículo endoplásmico liso y de marcada electroclaridad. (X 12.600)

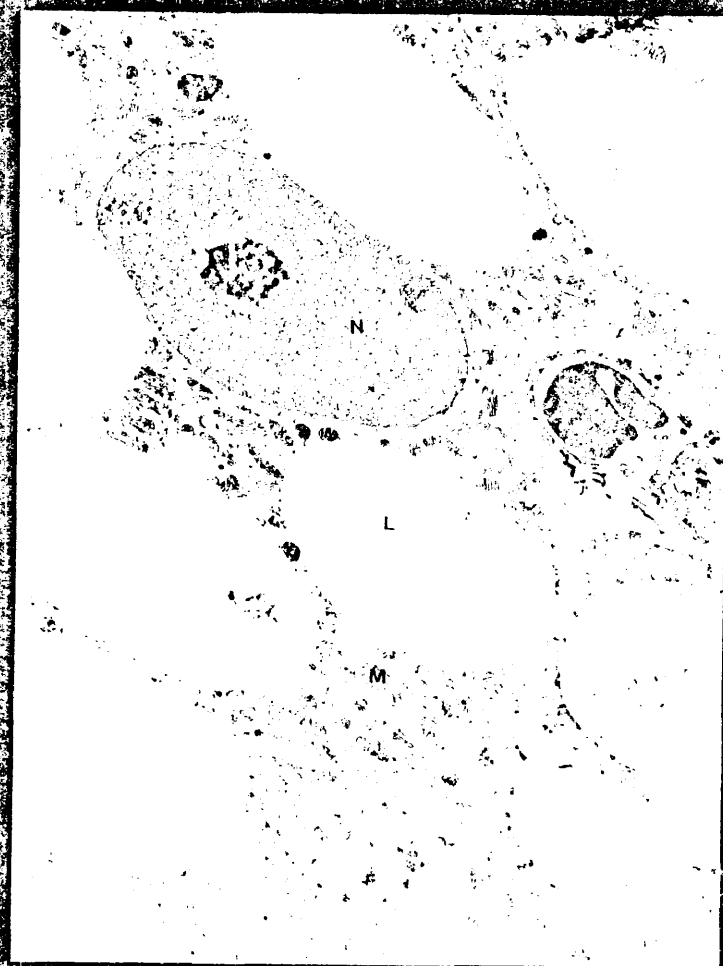


Lámina XXXIX

Fig. 54.- Adipocito pardo sometido a tratamiento con hidrocortisona mostrando una mayor coalescencia de las gotas lipídicas. (X 6.000)



Lámina XL

Fig. 55.- Detalle de la coalescencia de las gotas lipídicas en el adipocito pardo tratado. (X 19.000)



Lámina XLI

Fig. 56.- Gotas lipídicas con tendencia a la fusión. (X 3.000)

Fig. 57.- Coalescencia lipídica. (X 6.000)

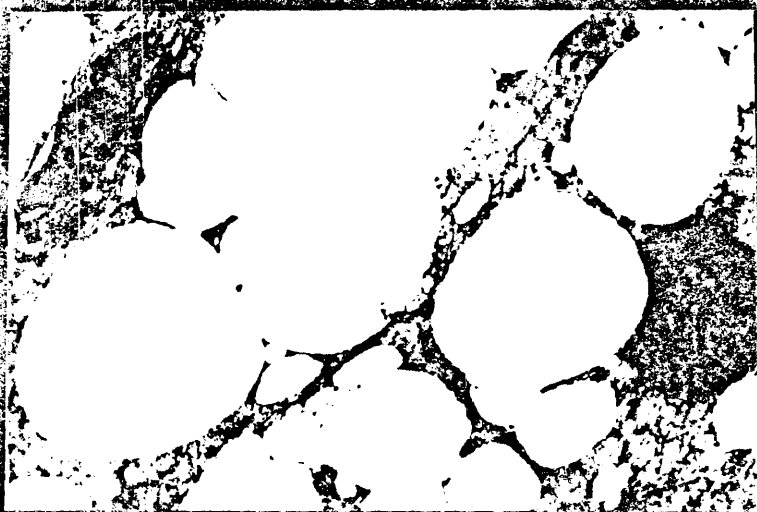
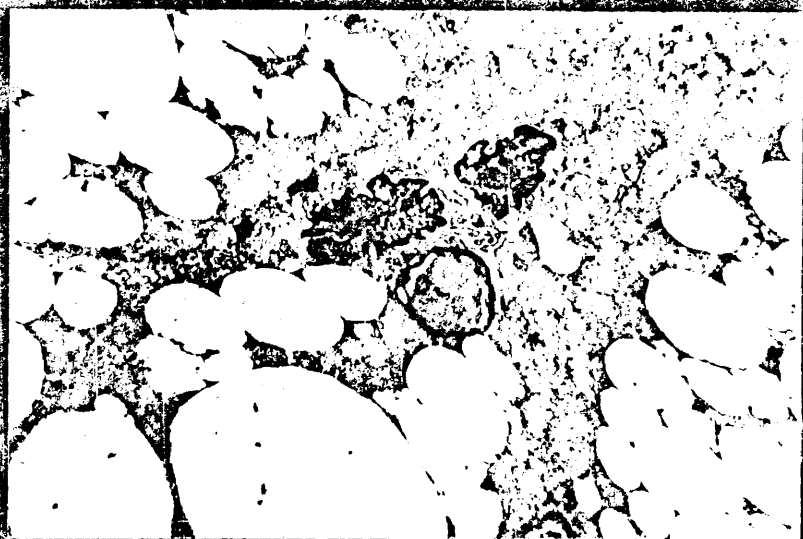


Lámina XLII

Fig. 58.- Gotas lipídicas formando un anillo en torno al núcleo y con tendencia a coalescer. (X 5.000)

Fig. 59.- Hialoplasma mostrando un fino carácter granular. (X 25.000)



Lámina XLIII

Fig. 60.- Cuerpo multivesicular. (X 87.300)

Fig. 61.- Cuerpo citolisosómico multivesicular (X 87.300)

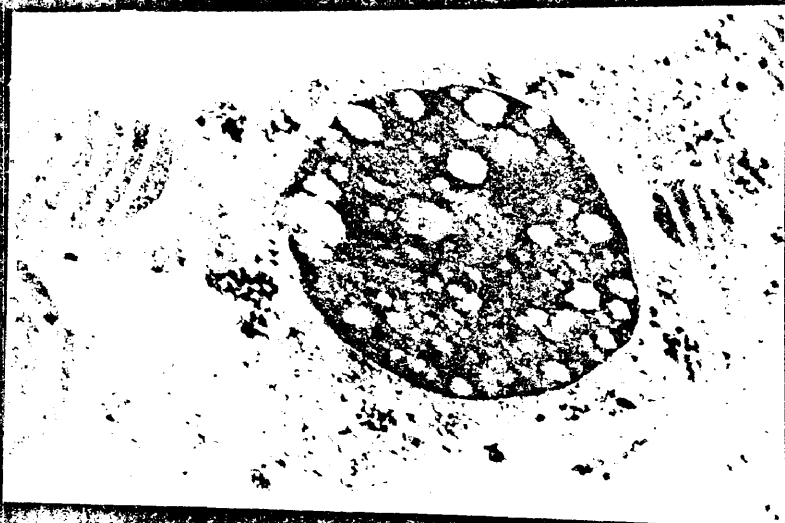


Lámina XLIV

Fig. 62.- Actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en hialoplasma del adipocito señalada por la presencia de gránulos de precipitado (X 18.000)

Fig. 63.- El lugar de acción del enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Se manifiesta por la aparición de precipitado en el seno - - hialoplásmico abundando en los márgenes del núcleo (X 28.100)

2-14



Lámina XLV

Fig. 64.- Actividad Glucosa-6-fosfato en hialoplasma. (X 36.000)

Fig. 66.- Actividad en lisosomas. (X 48.700)

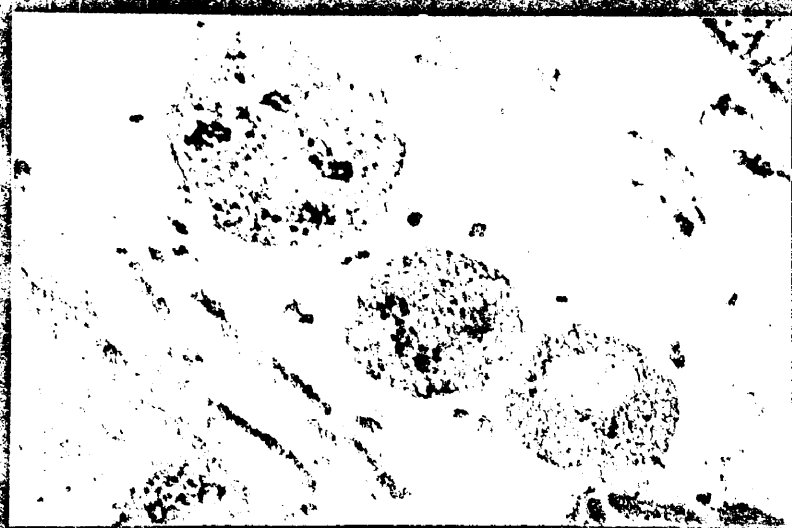
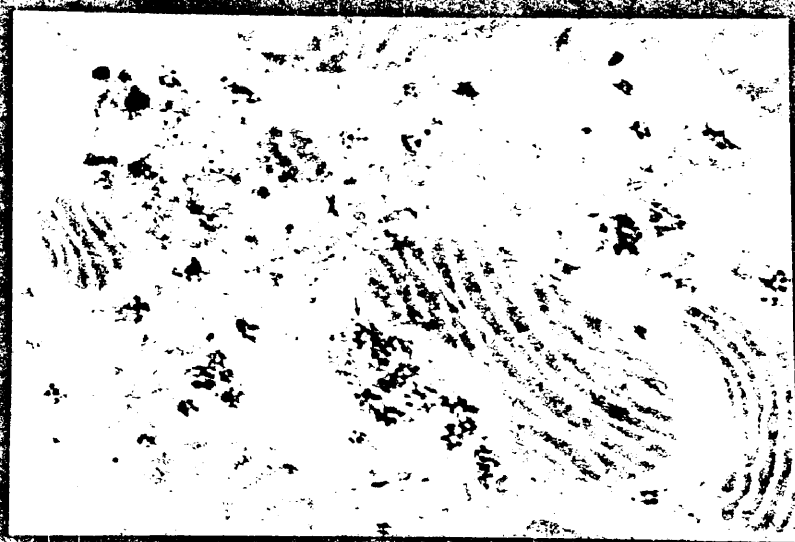


Lámina XLVI

Fig. 66.- Actividad NADH en el seno hialoplásmico (X 35.900)

Fig. 67.- Escasa actividad NADH en mitocondrias (X 18.100)

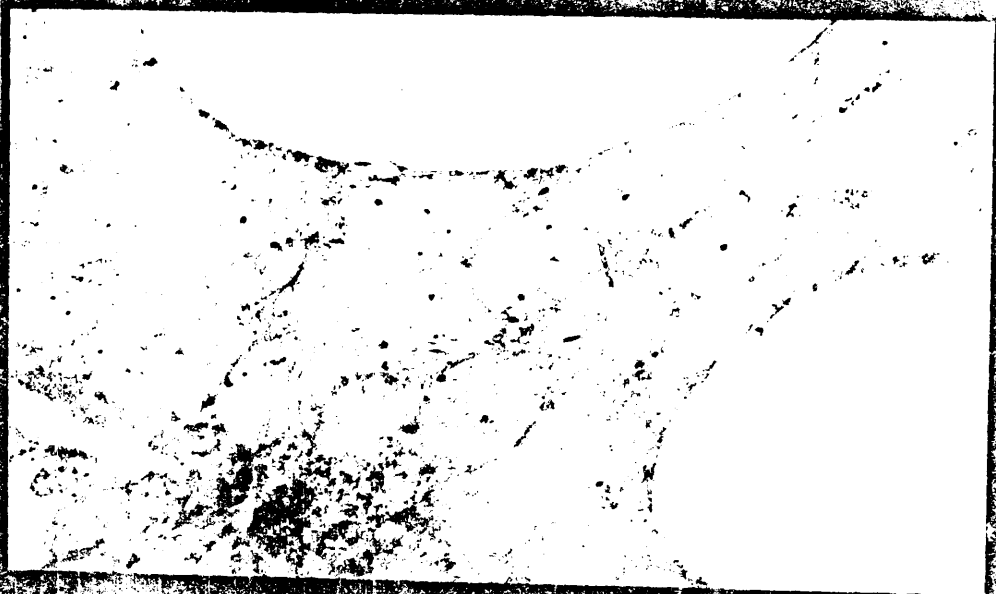
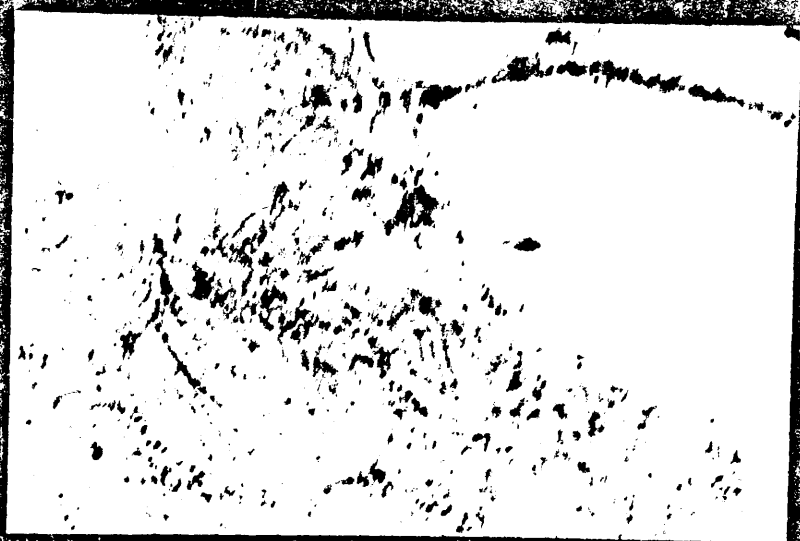


Lámina XLVII

Fig. 68.- El lugar enzimático de la Citocromooxidasa se encuentra en las crestas mitocondriales como se puede apreciar en la figura (X 76.000)

Fig. 69.- Actividad citocromo-oxidasa perfilando las crestas mitocondriales. (X 30.000)



Lámina XLVIII

Fig. 70.- Panorámica mitocondrial mostrando intensa actividad citocromo-
oxidasa. (X 23.000)

Fig. 71.- Microfotografía mostrando el mismo detalle de la actividad
citocromo-oxidasa (X 22.000)



Lámina XLIX

Fig. 72.- Actividad lipasa tisular en forma de gruecos precipitados (a)
en el adipocito pardo (X 55.000)

Fig. 73.- Actividad lipasa tisular intensa en la perigota (X 75.000)

2-17

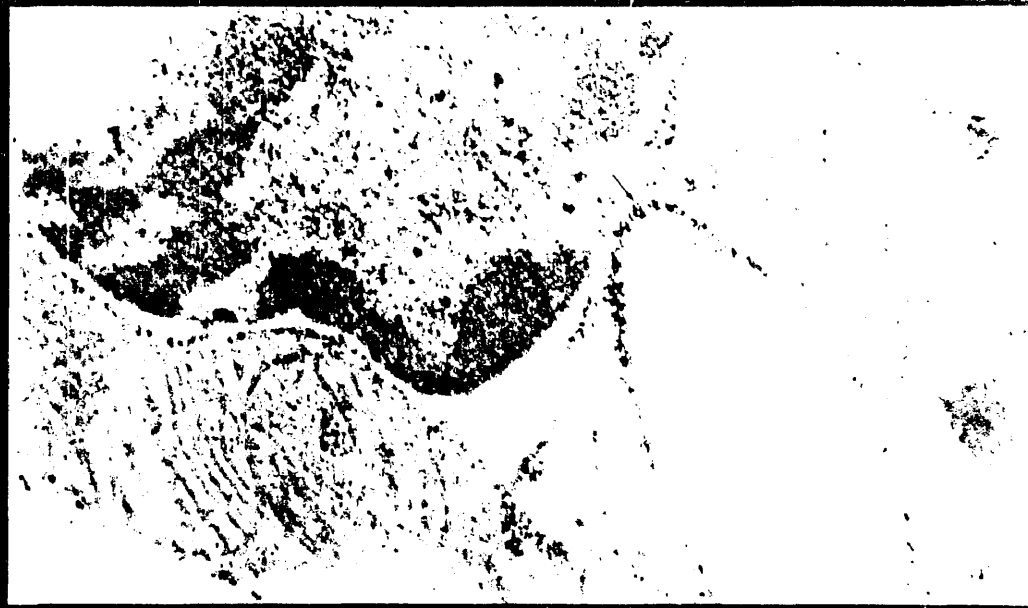
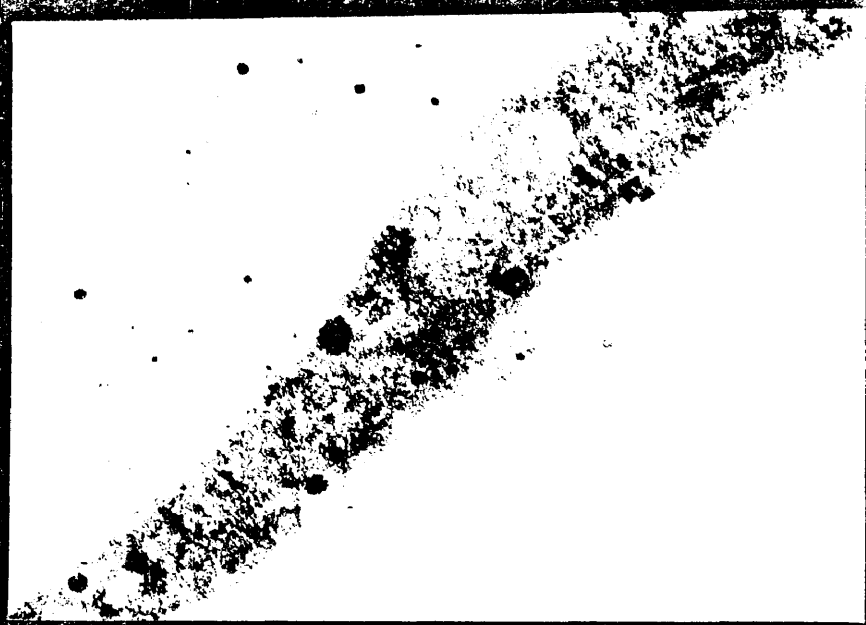


Lámina B

Fig. 74.- Actividad lipasa en el límite de la gota lipídica correspondiéndose morfológicamente con el retículo liso (X 80.000)



Lámina LI.

Fig. 75a.- Actividad g-6-PDH en rata control con escasa actividad hialg plásmica. (X 400)

Fig. 75b.- Mayor actividad de dicha enzima en el tejido adiposo pardo tratado con hidrocortisone. (X 400)

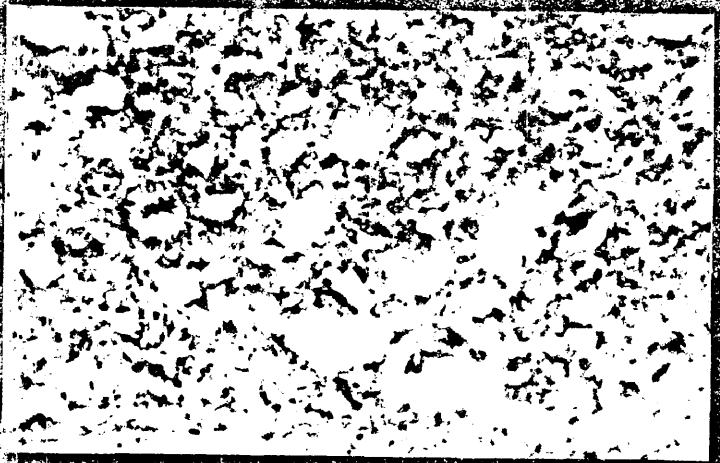
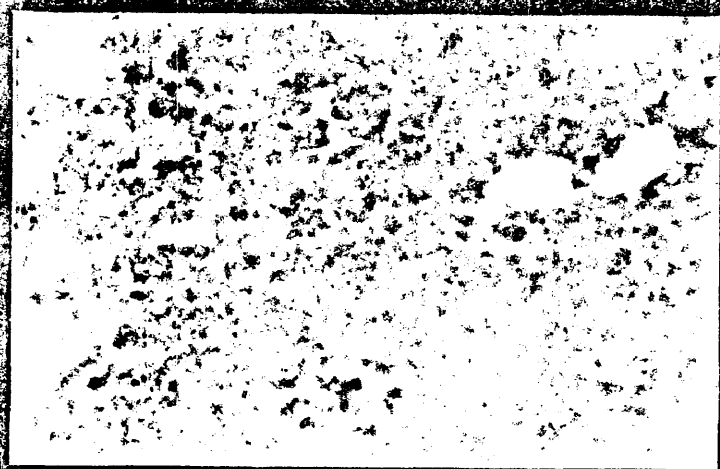


Lámina LII

Fig. 76a.- Actividad NADH en el citoplasma de los adipocitos pardos demostrada por la presencia de granos de precipitado de color azul. (X 400)

Fig. 76b.- Obsérvese una menor actividad de esta enzima en las ratas - tratadas con hidrocortisona. (X 400)

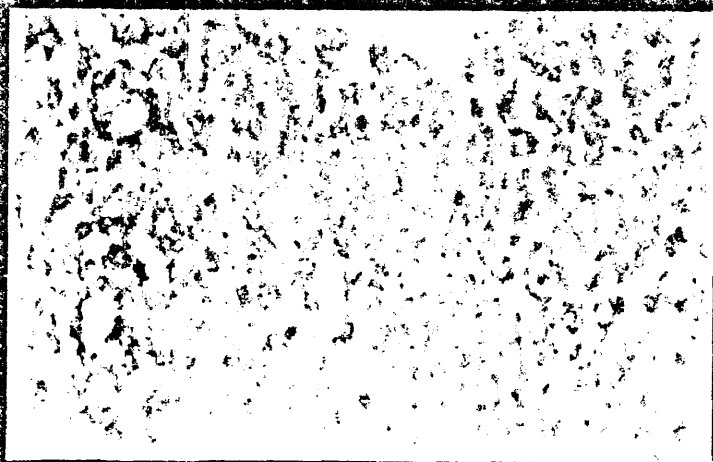
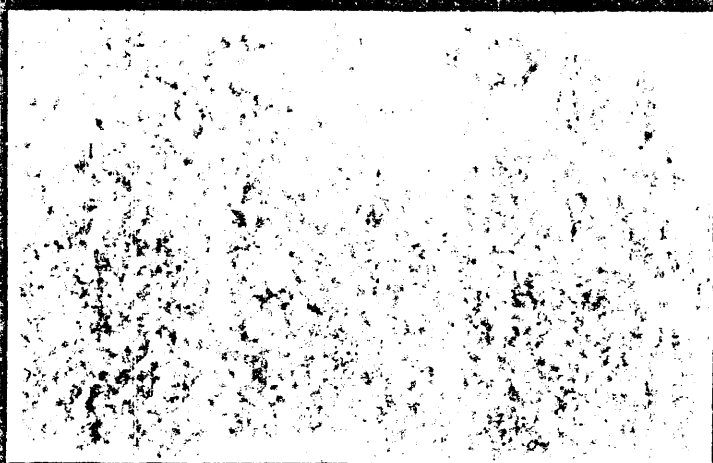


Lámina LIII

Fig. 77a.- Intensa actividad del enzima SDH mitocondrial observado en tejido adiposo pardo normal. (X 400)

Fig. 77b.- Disminución intensa de esta actividad en el tratamiento glucocorticoideo. (X 400)

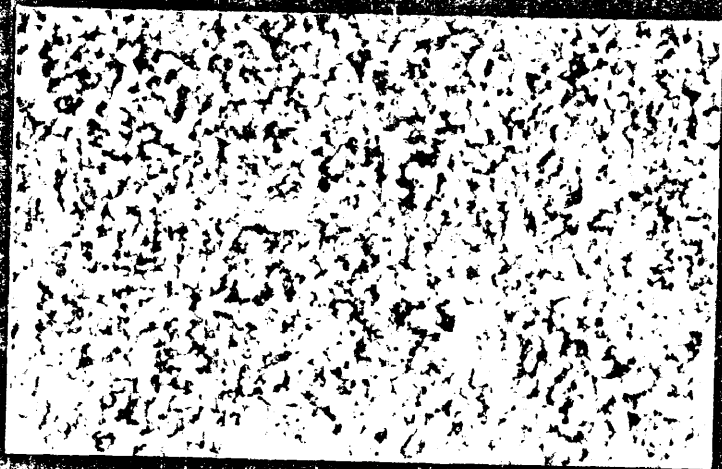
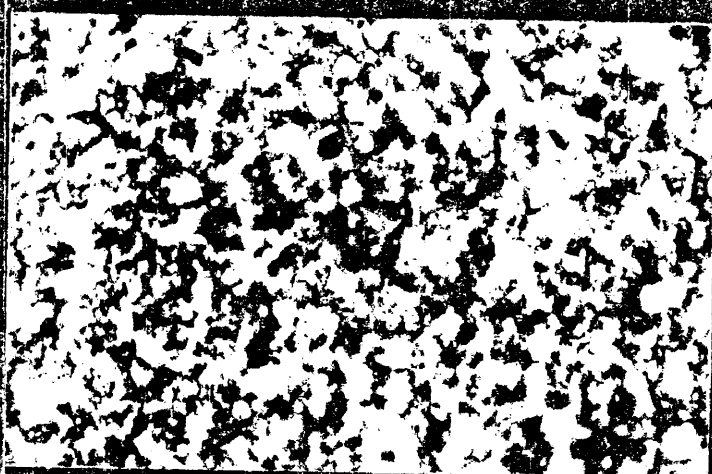


Lámina LIV

Fig. 78a.- Intensa actividad citoplásmica de la LDH en adipocitos normales. (X 400)

Fig. 78b.- Disminución de esta actividad en adipocitos bajo influencia de la hidrocortisona. (X 1.000)

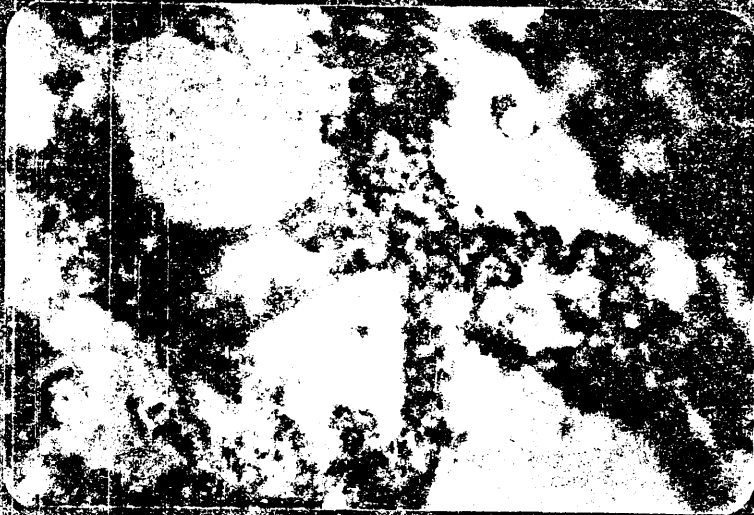
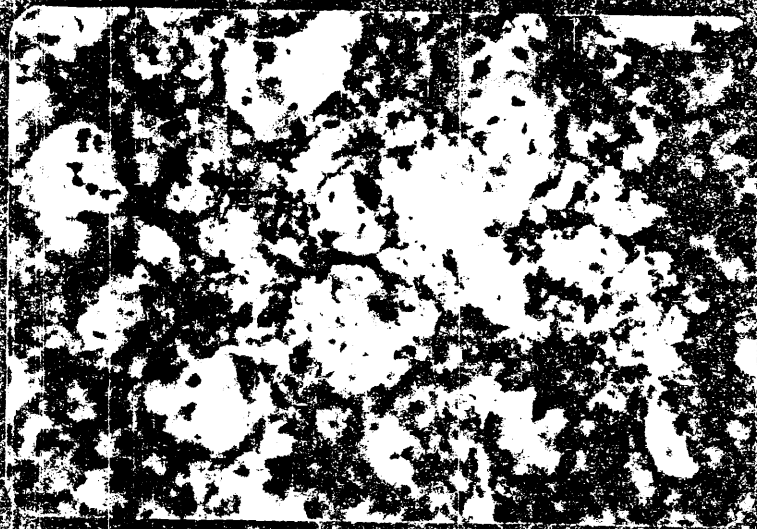


Lámina LV

Fig. 79a.- Testigo sin sustrato del enzima LDH donde se aprecia la carencia de actividad de este enzima en ratas control. (X 400)

Fig. 79b.- Testigo negativo en ratas inyectadas (X 400)

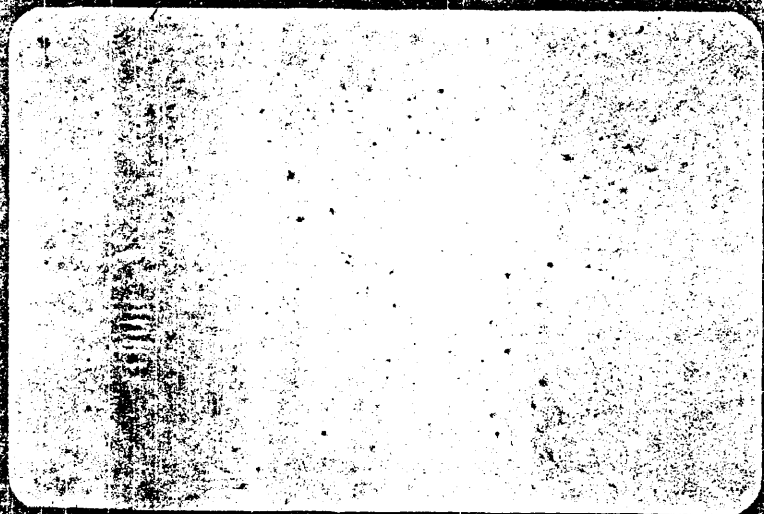
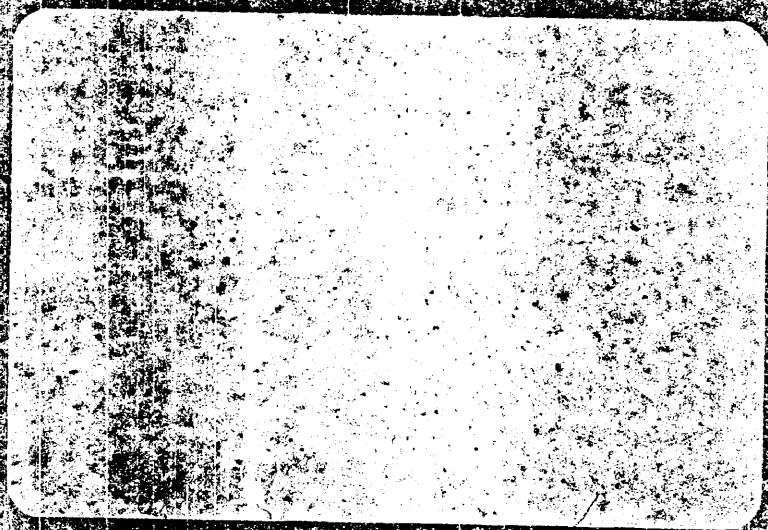


Lámina LVI

Fig. 80a.- Actividad MDH viene demostrada por la aparición de sales de formazana de color azul, localizándose intensamente en el citoplasma de ratas controles. (X 400)

Fig. 80b.- En las ratas sometidas a tratamiento esteroideo se observa una disminución de los depósitos de precipitado que indican el lugar de la actividad MDH (X 1.000)

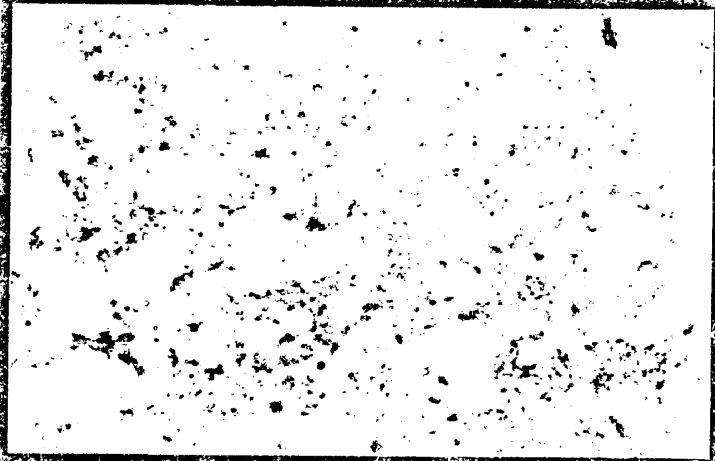
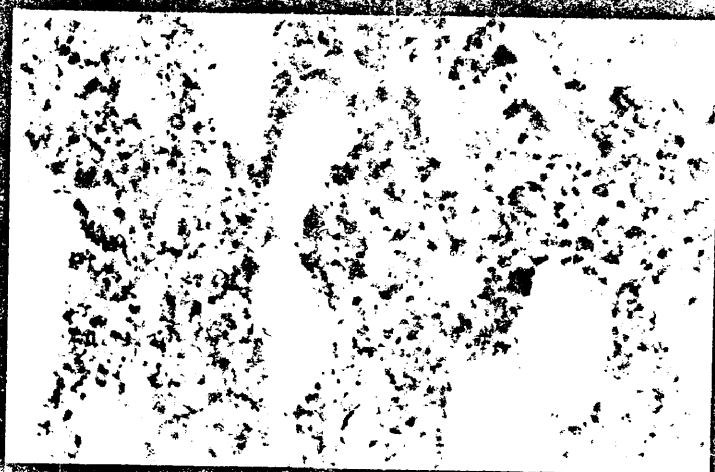


Lámina LVII

Fig. 81a.- Enzima NADH mitocondrial en tejido adiposo pardo normal (400)

Fig. 81b.- Disminución de actividad en el tratamiento con hidrocortisona. (X 400)



Lámina LVIII

Fig. 82a.- Intensa actividad citocromo-oxidasa demostrada por los acú-
mulos de precipitados de color pardo en el citoplasma estan
do los núcleos contrastados con hematoxilina. (X 400)

Fig. 82b.- Intensa disminución de la actividad mitocondrial de la cito
cromo-oxidasa en el tratamiento con glucocorticoides. (X 400)

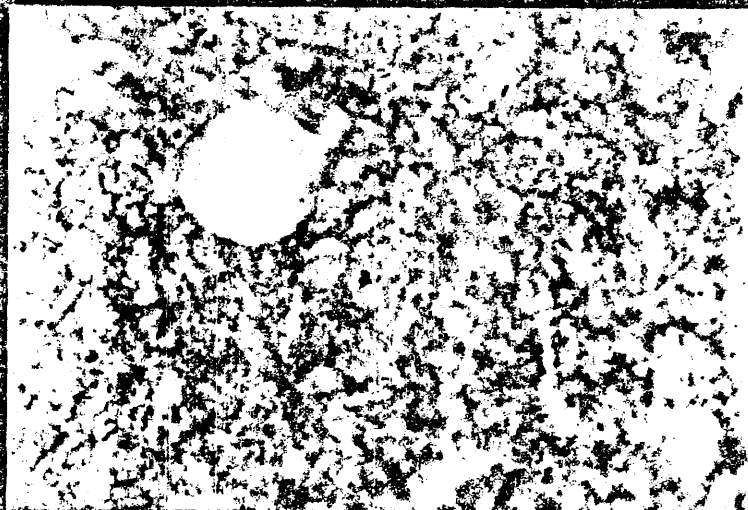
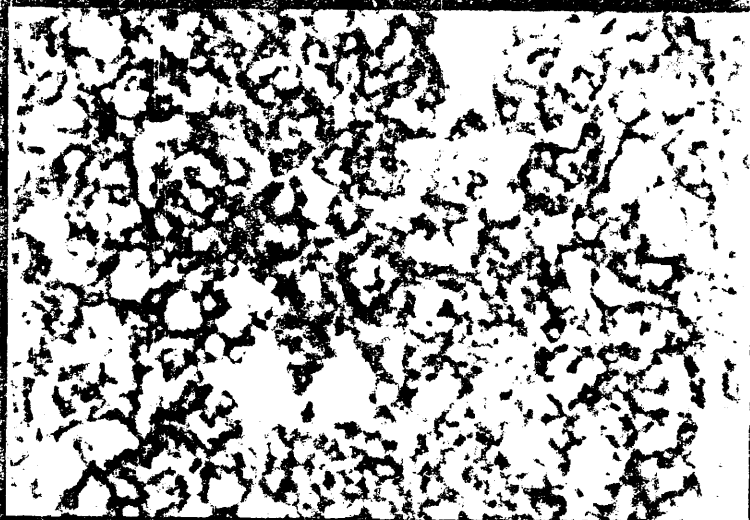


Lámina LIX

Fig. 83a.- α -Naftil-esterasa en el citoplasma de los adipocitos pardos.
(X 1.000)

Fig. 83b.- Incremento de actividad bajo tratamiento esteroideo.
(X 1.000)

157

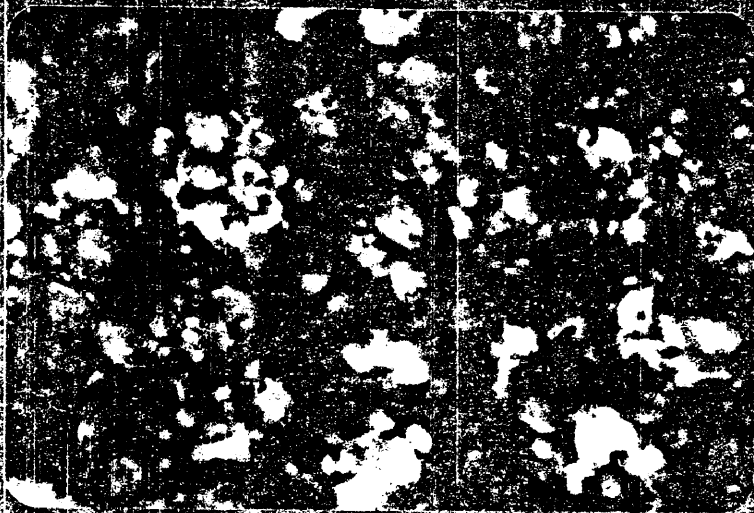
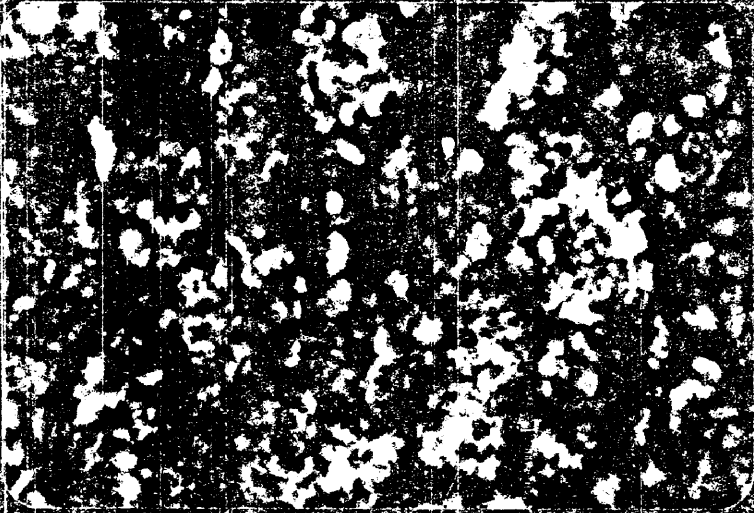


Lámina LX

Fig. 84a.- Testigo sin sustrato del α -Naftil-Esterasa en la que se observa la falta de actividad enzimática. (X 400)

Fig. 84b.- Igual a la anterior en rata inyectada. (X 400)

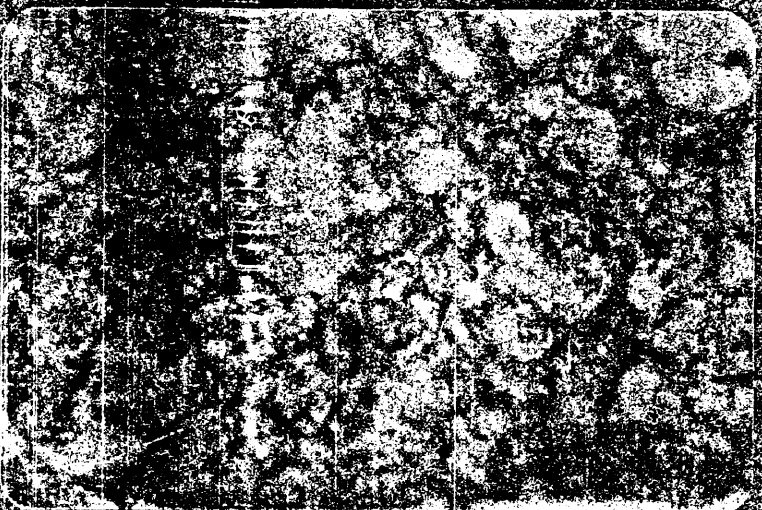
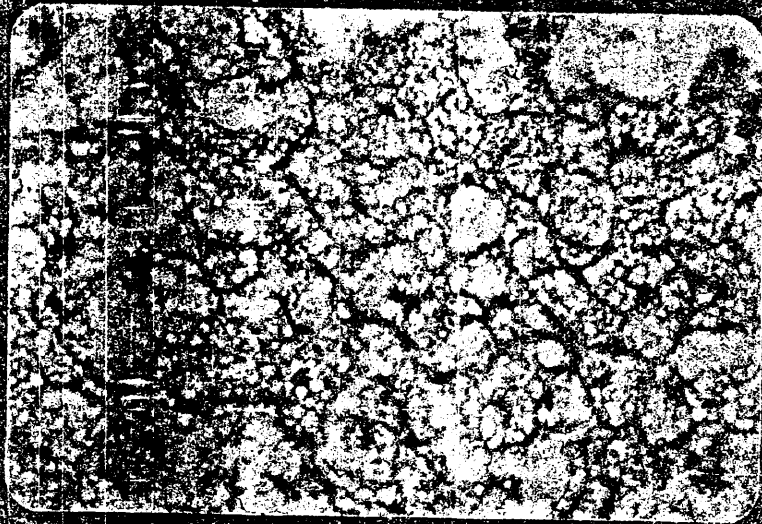


Lámina LXI

Fig. 85a.- El enzima β -Esterasa muestra su actividad ténua en el citoplasma de los adipocitos pardos normales. (X 400)

Fig. 85b.- Esta actividad se halla incrementada en el tratamiento con hidrocortisona (X 400)

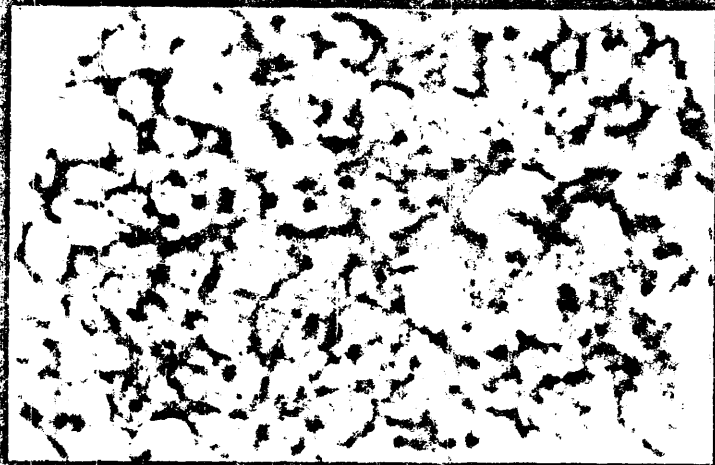
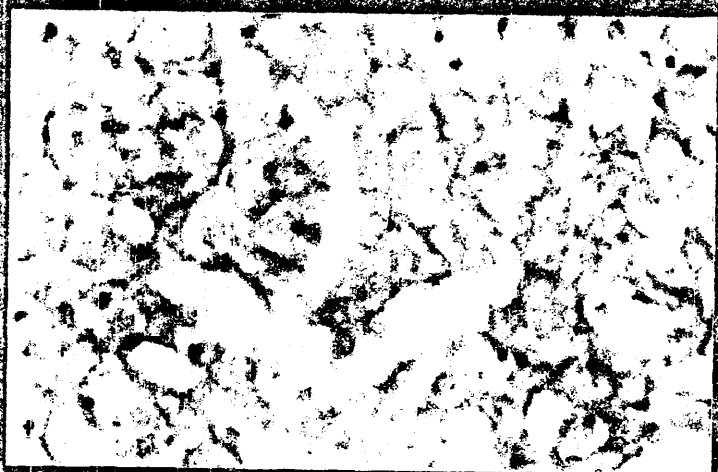


Lámina LXII

Fig. 86a.- La lipasa tisular se observa por la formación de grandes -
acúmulos de precipitado de color pardo en ratas control.
(X 400)

Fig. 86b.- Estos animales son mayores bajo tratamiento esteroideo, lo -
que nos indica su incremento en dicha actividad. (X 400)

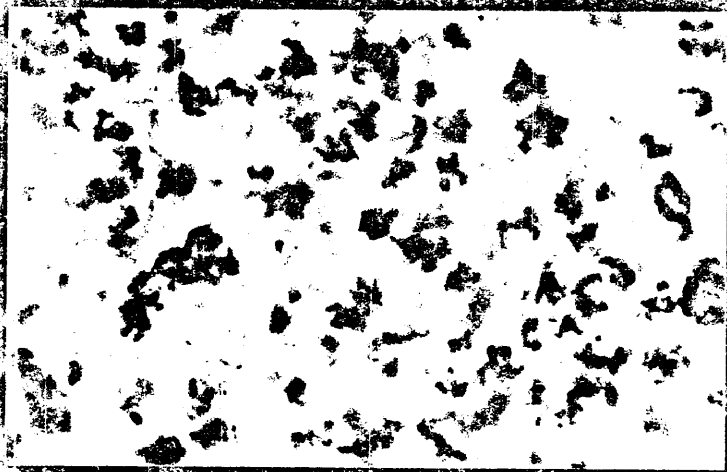


Lámina LXIII

Fig. 87a.- Testigo negativo de la actividad lipásica en ratas control.
(X 400)

Fig. 87b.- Falta de actividad en la incubación sin sustrato de los adipocitos inyectados. (X 400)

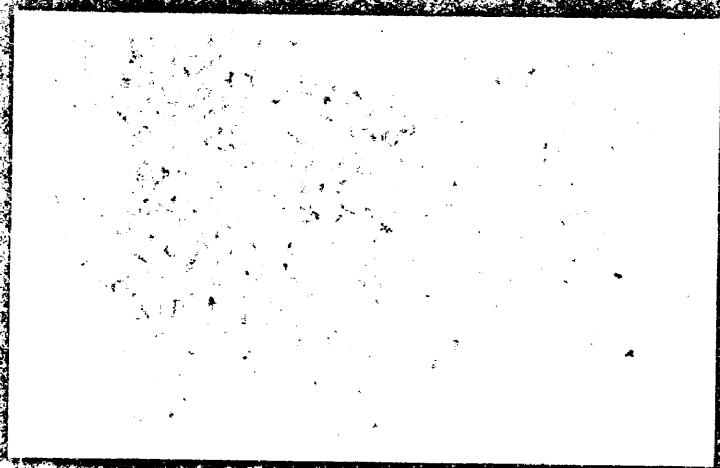


Lámina LXIV

Fig. 88a.- Escasa actividad fosfatasa ácida en adipocitos normales.
(X 400)

Fig. 88b.- Aumento de actividad con respecto a la anterior en adipocitos bajo tratamiento esteroideo. (X 400)

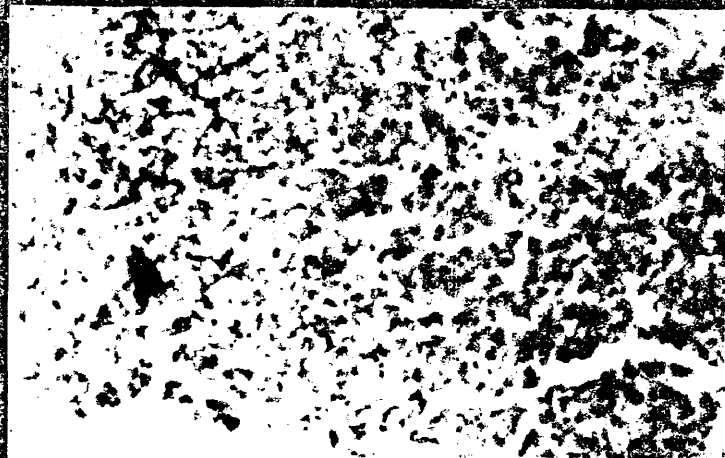
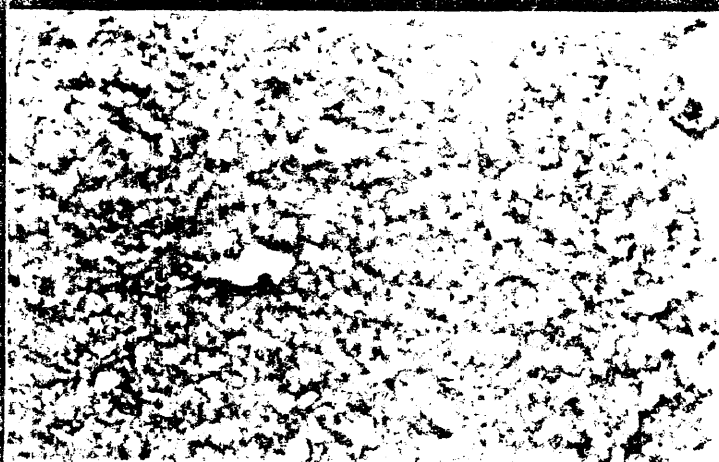


Lámina LXV

Fig. 89a.- Intensa actividad en el lecho vascular y discreta en el parén
quima del tejido adiposo pardo normal

Fig. 89b.- Aumento de actividad ATPasa sobre todo en el parénquima del
tejido adiposo de estos con tratamiento de hidrocortisona.
(X 400)

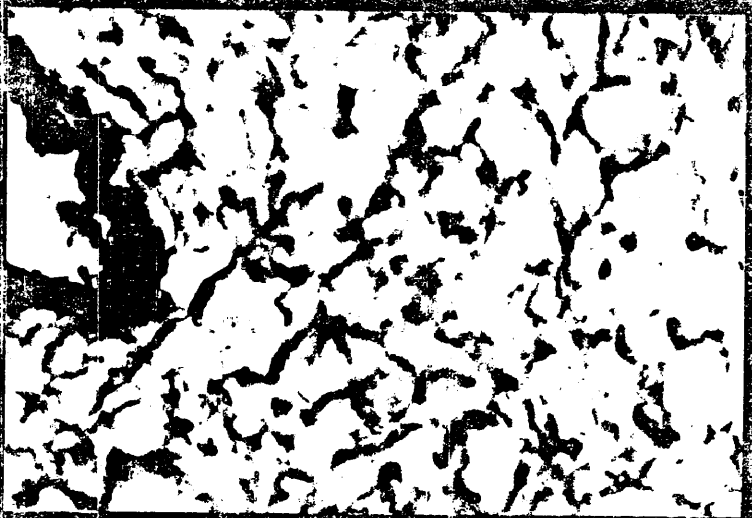


Lámina LXVI

Fig. 90a.- La fosfatasa alcalina se localiza en el endotelio de los vasos dibujando el contorno del lecho vascular. (X 400)

Fig. 90b.- Ligero aumento de esta actividad en adipocitos con tratamiento esteroideo. (X 400)

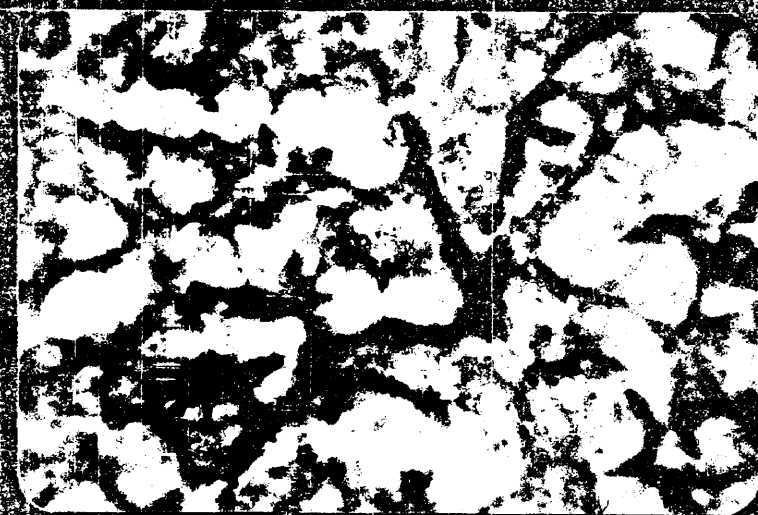
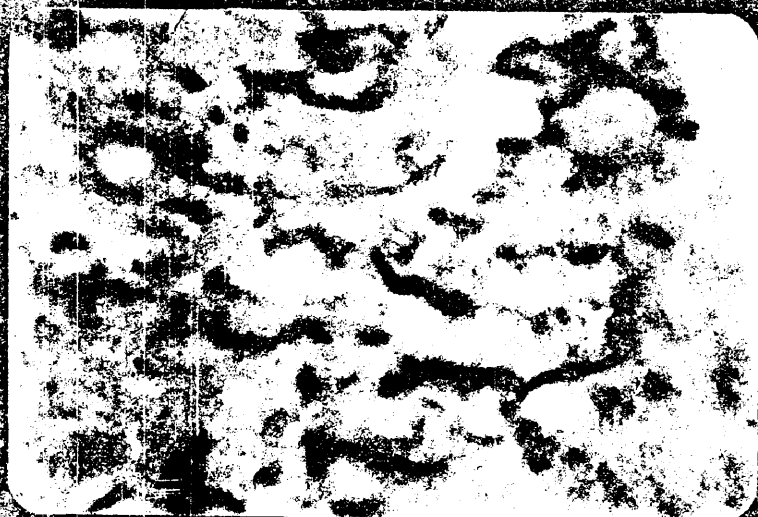


Lámina LXVII

Fig. 91a.- Incubación sin sustrato del enzima Fosfatasa alcalina con actividad totalmente negativa en tejido adiposo pardo normal.
(X 400)

Fig. 91b.- Igual a la anterior en ratas bajo el tratamiento con hidrocortisone (X 400)

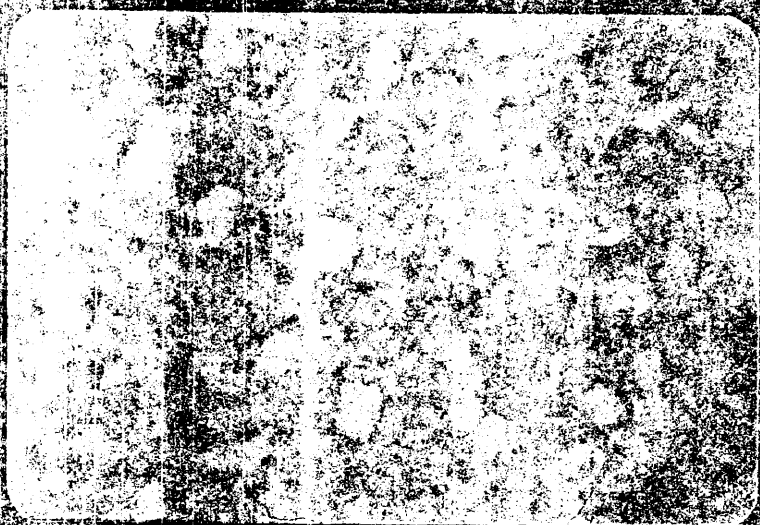


Lámina LXVIII

Fig. 92.- Actividad Lipoproteína-lipasa contrastada con NO_2Pb , después de incubación con lípidos standar. (X 400)

Fig. 93.- Actividad lipoproteína-lipasa contrastada con Os después de incubación con lípidos standar. (X 400)

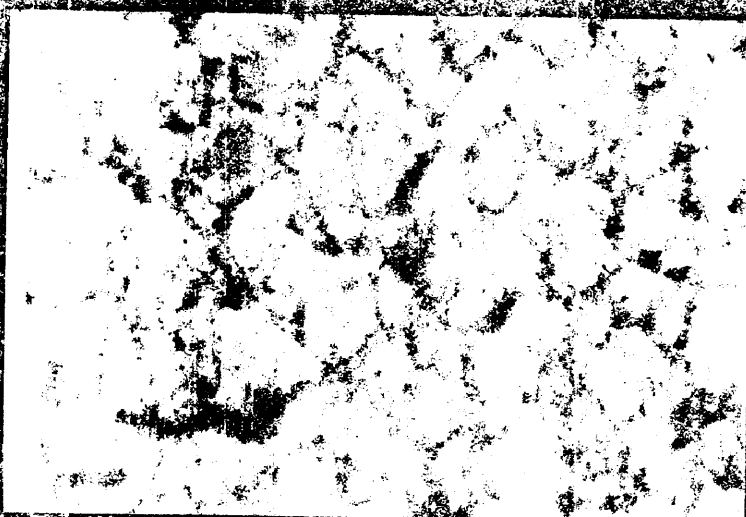
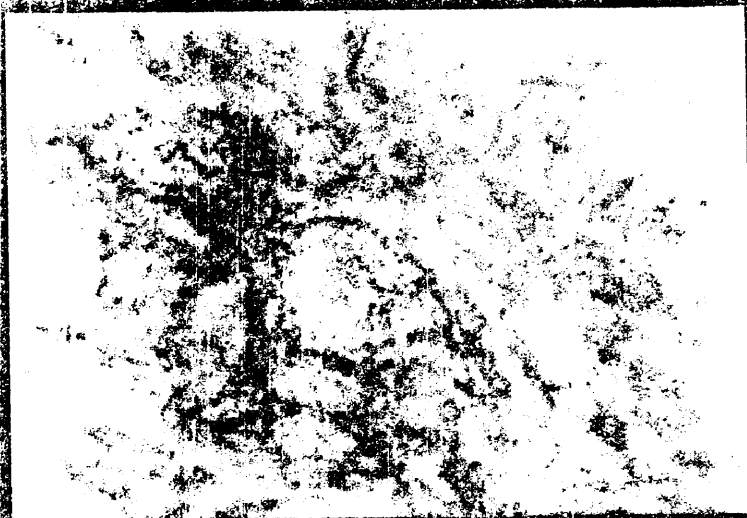


Lámina LXIX

Fig. 94.- Activación Lipoprotein-lipasa con previo paso por acetona-
-eter y contrastados los grupos aldehídicos de los ácidos
grasos con el reactivo de Schiff. (X 1.000)

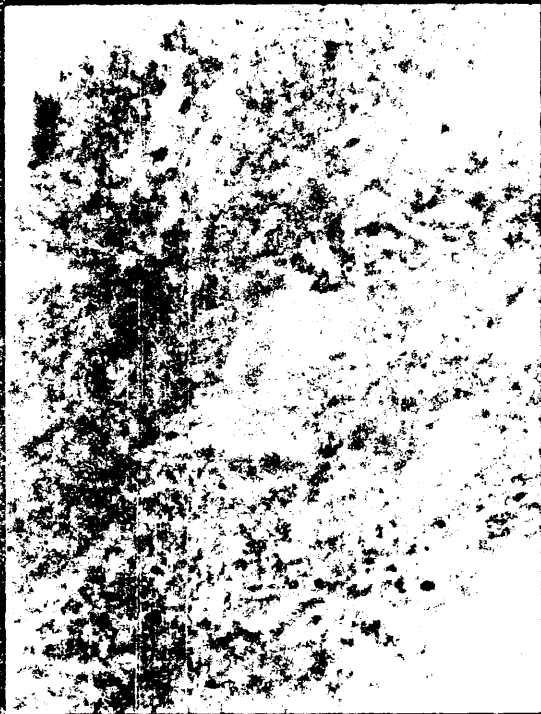


Lámina LXX

Fig. 95a.- Actividad lipoproteín-lipasa incubada con VOL en tejido
adiposo pardo normal y contrastada con NO_3Pb (X 1.000)

Fig. 95b.- Igual en tejido con tratamiento esteroideo (X 1.000)

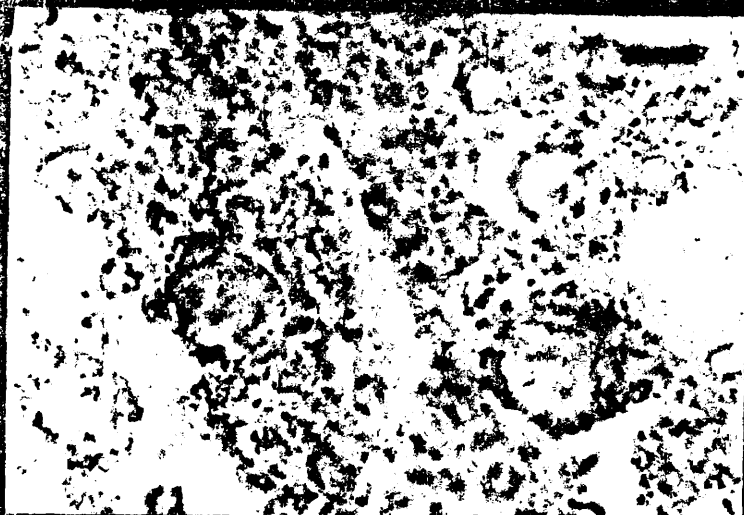
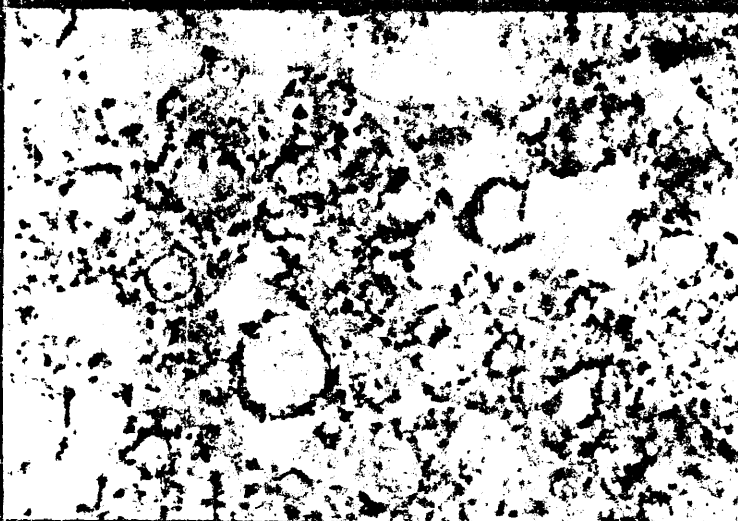


Lámina LXXI

Fig. 96a.- Actividad LPL incubada con quilomicrones y contrastada con
Ov. (X 1.000)

Fig. 96b.- Igual en tejido adiposo pardo inyectado. (X 1.000)

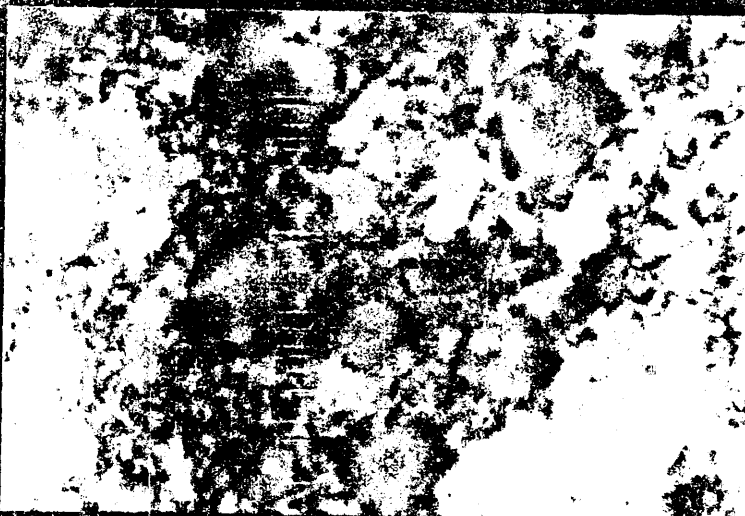


Lámina LXXII

Fig. 97a.- Actividad LPL incubada con quilomicrones y contrastada con NO_3Pb . (X 1.000)

Fig. 97b.- Actividad LPL incubada con quilomicrones y contrastada con NO_3Pb en rata inyectada. (X 1.000)

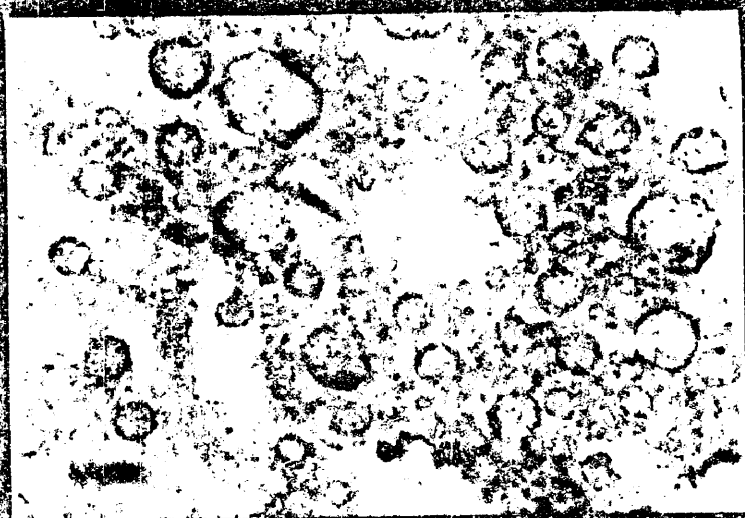
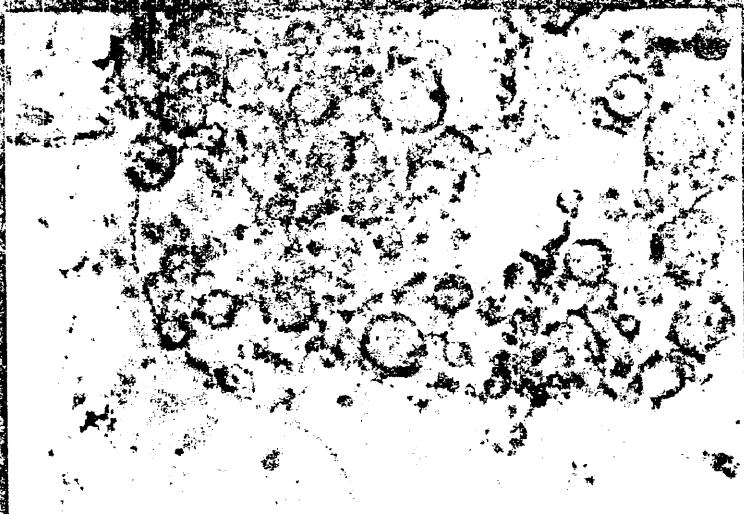


Lámina LXXIII

Fig. 98.- Incubación sin heparina y contrastada con NO_3Pb . (X 400)

Fig. 99.- Incubación sin heparina y contrastada con Cu (X 400)

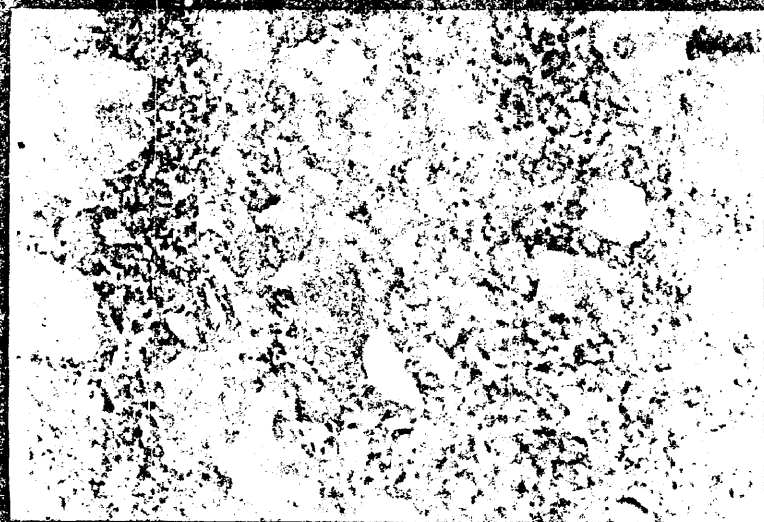


Lámina LXXIV

Fig. 100.- Ratas de 21 días momentos antes del sacrificio. Los de la fila superior son inyectados, y los de la inferior controles. No hay diferencias significativas entre ambos tipos.

